



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Evaluación química toxicológica de los plaguicidas
organofosforados en agricultores, y en uvas y
manzanas**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Bromatología

AUTOR

Jesús Víctor LIZANO GUTIERREZ

ASESOR

Mafalda Nancy LOZANO REYES

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Lizano J. Evaluación química toxicológica de los plaguicidas organofosforados en agricultores, y en uvas y manzanas [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2016.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú. DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BROMATOLOGÍA

Siendo las 10:00 hrs. del 21 de enero del 2016 se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por la Dra. Augusta Isabel Córdova Gutiérrez e integrado por los siguientes miembros: Dra. Nancy Mafalda Lozano Reyes (Asesora), Dra. Gladys Constanza Arias Arroyo, Dr. Mesías Moisés García Ortiz y la Dra. Yadira Fernández Jeri; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: "EVALUACIÓN QUÍMICA TOXICOLÓGICA DE LOS PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN AGRICULTORES, Y EN UVAS Y MANZANAS" presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica JESÚS VÍCTOR LIZANO GUTIÉRREZ.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Bromatología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la votación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Diecinueve (19), EXCELENTE

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Farmacia y Bioquímica JESÚS VÍCTOR LIZANO GUTIÉRREZ, el Grado Académico de **Magíster en Bromatología**.

Siendo las 12 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 12:15 hrs. del 21 de enero 2016.

Dra. Augusta Isabel Córdova Rivera (P.P.D.E.)
Presidenta

Dra. Nancy Mafalda Lozano Reyes (P.P.D.E.)
Miembro - Asesora

Dra. Gladys Constanza Arias Arroyo (P.P.T.C.)
Miembro

Dr. Mesías Moisés García Ortiz (P.P.T.C.)
Miembro

Dra. Yadira Fernández Jeri (P. ASOC. T.C.)
Miembro

Observaciones:

se recomienda la publicación

DEDICATORIA

A la memoria de mi querida Madre Hilda, que debe estar muy feliz al lado de nuestro creador.

A mi esposa Delma por su gran amor, comprensión y apoyo.

A mis hijos Lester y Ronald, por el gran amor que nos tenemos y ser mi máximo incentivo y motivación para lograr estos éxitos.

A la memoria de mis hermanos María Luz, Ciro, Haydee y Víctor que siempre me acompañan.


A mi hermana Sonia por el gran cariño que nos tenemos.

A la memoria de mis grandes maestro Marcos Herrera Ardiles, Rubén Gil Salas y Gumersindo Celedonio por su ejemplo y enseñanzas.

AGRADECIMIENTO

Gracias Dios, porque me bendices cada día con un nuevo amanecer, por enseñarme que todos los días son siempre muy buenos días, iniciando con una sonrisa y terminando de la misma forma. Porque me llenas de felicidad limitando mis deseos en lugar de satisfacerlos, porque cuando cierras una puerta, me abres otras dos; pues he comprendido que la felicidad no es una meta sino un trayecto; porque cuando borras algo de mi vida es porque te alistás a escribir algo mejor para mí, susurrándome al oído, que cuando pierda, nunca olvide

la lección; porque nunca me mandarás más de lo que puedo soportar, pues no me das una carga apta para mis hombros, sino unos hombros para soportar las cargas, convirtiendo mis abismos en oportunidades para volar hacia mis sueños.

Gracias por regalarme el Hoy y llamarlo “Presente”; por permitir que mi caminar deje una huella que me libre del pasado, convirtiéndome en el arquitecto de mi futuro, el amo de mi destino y el capitán de mi alma; porque me das razones para amarte que la razón no comprende, porque tu amor es como el mar, se ve el inicio pero no el final, porque eres la  de mi vida, pues sin ti sería un eterno desafinado en el inmenso coro de la humanidad.

Gracias por enseñarme que en educación, más que cabezas se requieren corazones, por hacer que mi felicidad no dependa de lo que tenga sino de lo que soy y me presentas a la adversidad no como el enemigo sino como el mejor maestro.

Gracias, por hacerme el primer héroe de mis hijos y envejecer junto al amor de mi vida... gracias porque en mis oraciones no me dices buenas noches, sino...nos vemos en tus sueños.

A mi asesora Dra. Nancy Lozano Reyes

Por su motivación en la realización de este tema, su invaluable apoyo, por su paciencia, minuciosidad, pericia y ética en el desarrollo del mismo, demostrando una vez más su compromiso profesional para ser un apoyo generoso al desarrollo de los profesionales en el área que su experiencia y preparación lo acreditan.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

INDICE GENERAL

RESUMEN

SUMARY

Pag.

| | |
|---|-----------|
| CAPITULO I: INTRODUCCION | 01 |
| 1.1 SITUACION PROBLEMÁTICA. | 02 |
| 1.2 FORMULACION DEL PROBLEMA | 04 |
| 1.3 JUSTIFICACION TEORICA | 04 |
| 1.4 JUSTIFICACION PRACTICA | 05 |
| 1.5 OBJETIVOS | 06 |
| 1.5.1 OBJETIVO GENERAL | 06 |
| 1.5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS | 06 |
| CAPITULO II: MARCO TEORICO | 07 |
| 2.1 MARCO FILOSOFICO O EPISTEMOLOGICO DE LA INVESTIGACION | 07 |
| 2.2 ANTECEDENTES DE INVESTIGACION | 08 |
| 2.3 BASES TEORICAS | 10 |
| 2.3.1 PLAGUICIDAS | 10 |
| 2.3.2 DETERMINACION DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS DE FRUTAS | 12 |
| 2.3.3 PELIGROS PARA LA SALUD DE LOS PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS | 13 |
| 2.3.4 LOS PLAGUICIDAS Y EL CANCER | 16 |
| 2.3.5 PROVINCIA DE CAÑETE | 20 |
| 2.3.5.1 DISTRITO DE SANTA CRUZ DE FLORES | 20 |
| 2.3.5.2 DISTRITO DE CALANGO | 22 |
| 2.3.5.3 MANZANA DELICIA | 23 |
| 2.3.5.4 UVA QUEBRANTA | 26 |
| CAPITULO III: METODOLOGIA | 28 |

| | |
|---|----|
| 3.1 TIPO DE INVESTIGACION | 28 |
| 3.2 DISEÑO DE INVESTIGACION | 28 |
| 3.3 AMBITO DE ESTUDIO | 28 |
| 3.3.1 ANÁLISIS QUÍMICO TOXICOLÓGICO | 28 |
| 3.3.2 TRABAJO DE CAMPO | 28 |
| 3.4 MUESTREO | 28 |
| 3.4.1 MUESTREO DE MANZANAS Y UVAS | 28 |
| 3.4.2 ENCUESTA A LOS AGRICULTORES | 28 |
| 3.5 METODO DE QwE ChERs | 28 |
| 3.5.1 OBJETIVOS | 29 |
| 3.5.2 CAMPO DE APLICACIÓN | 29 |
| 3.5.3 TECNICA OPERATORIA | 30 |
| 3.5.3.1 PRINCIPIO | 30 |
| 3.5.3.2 MATERIALES Y EQUIPOS | 30 |
| 3.5.3.3 REACTIVOS | 32 |
| 3.5.3.4 PREPARACION DE LOS ESTANDARES DE LA CURVA MATRIZ DE LOS PLAGUICIDAS ANALIZADOS POR LC/MS-MS Y CC-MS | 33 |
| 3.5.3.5 ANALISIS DE LA MUESTRA | 36 |
| 3.5.3.6 OPTIMIZACION DEL METODO | 39 |
| 3.5.3.7 CÁLCULO Y EXPRESION DE RESULTADOS | 42 |
| CAPITULO IV: RESULTADOS | 45 |
| CAPITULO V: DISCUSION | 64 |
| CONCLUSIONES | 66 |
| RECOMENDACIONES | 67 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 68 |
| ANEXOS | 73 |
| ANEXO N°1 PLAGUICIDAS ANALIZADOS POR HPLC-MS/MS | 73 |
| ANEXO N°2 PLAGUICIDAS ANALIZADOS POR GC-MS | 76 |
| ANEXO N°3 LISTADO DE MATRICES IMPLEMENTADAS | 80 |
| ANEXO N°4 PLAGUICIDAS ANALIZADOS POR HPLC-MS/MS MODO MODO DE IONIZACION ESI POSITIVO | 81 |
| ANEXO N°5 FICHA DE ENCUESTA PARA LOS AGRICULTOR | 85 |

RESUMEN

La manzana y la uva son frutas muy consumidas por el hombre, especialmente en nuestro medio ya que forma parte de la lonchera, especialmente de los niños, por ello se investigó la presencia de plaguicidas órgano fosforados por el método de la AOAC Official Method 2007.01 “Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate”. La extracción se hizo con acetonitrilo en medio tamponado con ácido acético-acetato de sodio seguido de un clean-up combinada con amina primaria secundaria y sulfato de magnesio, para finalmente ser analizado por LC/MS-MS (cromatógrafo líquido acoplada con espectrofotómetro de masas en tándem y GC-MS (cromatógrafo de gases acoplada a espectrofotómetro de masas).

Se tomaron 10 muestras de manzanas (05 de Calango y 05 de Santa Cruz de Flores) y 10 muestras de uvas (05 muestras de Calango y 05 muestras de Santa Cruz de Flores) de la provincia de Cañete.

No se encontraron residuos de plaguicidas órgano fosforados. El 100 por ciento de las uvas presentan residuos de otros plaguicidas tales como Ciprodenil y Piroclostrobin y el 50 por ciento de las manzanas presentan los plaguicidas Tebuconazol y Cipermetrina.

Los agricultores de los distritos de Calango y Santa Cruz de Flores no reciben información sobre el peligro del uso de los plaguicidas y no utilizan los implementos de protección personal adecuada.

Palabras clave:

LC/MS-MS, GC/MS, residuo, plaguicida, clean-up.

SUMMARY

Apples and grapes are fruits very consumed by people, especially in our country as part of the lunchbox, particularly for children. For that reason, it was investigated the presence of phosphorus pesticides bodies by the AOAC Official Method 2007.01 - "Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and partitioning with Magnesium Sulfate". The extraction was done with acetonitrile in buffered medium with acetic acid - sodium acetate followed by a clean-up, combined with primary secondary amine, and magnesium sulfate, to finally be analyzed by LC / MS-MS (liquid chromatograph accepted with mass spectrometer in Tandem) and GC-MS (gas chromatograph coupled to mass spectrometer). Ten (10) samples of apples, five (5) samples of Calango and five (5) samples of Santa Cruz de Flores, from the Cañete province were taken. No organ-phosphorus pesticide residues were found. The 100% of the grapes presents other pesticides residues such as and Pyraclostrobin and Cyprodinil, and the 50% of apples presents pesticides such as tebuconazole and cypermethrin.

Calango and Santa Cruz de Flores districts do not receive information about the danger of the use of pesticides and do not use the proper personal protective equipment.

Keywords:

LC/MSMS, GC-MS, Residue, Pesticide, Clean-Up.

CAPITULO I: INTRODUCCION

Una de las tareas más importantes para la agricultura mundial es reducir el uso de plaguicidas. Perú no permanece ajeno a este desafío y es por ello que trata de reducir su uso o emplear los menos nocivos.

El uso de fitofármacos en el cultivo de los alimentos pueden provocar inconvenientes, tales como: las consecuencias toxicológicas, por la ingesta de los cultivos destinado a consumo humano y problemas en la comercialización del producto, cuando los residuos superan las tolerancias exigidas para un determinado mercado.

Para evitar que se presenten estos problemas, el productor debe disponer de la información necesaria para utilizar, en sus cultivos, los plaguicidas en forma racional. Existe una amplia bibliografía en el ámbito internacional sobre este tema y a nivel local los Ministerios de Agricultura, de Salud y del Ambiente realizan trabajos sobre curvas de degradación de pesticidas en productos alimenticios.

Por ello los desafíos para obtener alimentos inocuos son cada vez mayores, lo que significa minimizar el uso de estos plaguicidas y con ello, la presencia de residuos en los alimentos. Por eso, se deben desarrollar estrategias de manejo fitosanitario para frutales de consumo interno y de exportación tendientes a reducir el empleo de plaguicidas, para obtener frutas de alta calidad de consumo y de exportación que permita competir de igual modo con otros países productores y obtener el reconocimiento de estos como alimentos inocuos, con estándares internacionales que certifiquen productos libres de residuos, tal como lo hacen países como Nueva Zelanda.^{1,2}

Por lo tanto la contaminación de alimentos es de gran importancia, un ejemplo se da en la ingesta de manzana y uva, frutas de gran consumo en el Perú, especialmente en las loncheras de los niños, por ser económicas. En sus cultivos se utilizan una gran

variedad de plaguicidas. El incremento en el uso de estos ha tenido como consecuencia que se encuentren residuos de estos compuestos en dichas frutas dando lugar a la reducción de su calidad. Los plaguicidas más utilizados para estos cultivos son los organofosforados y los organocarbámicos, lo que motivó la realización del presente trabajo.^{3,4}

1.1. Situación Problemática

Actualmente el uso de los plaguicidas es un problema de suma importancia en Salud Pública; ya que su uso contribuye a mejorar las cosechas cuyo rendimiento es particularmente importante para los pobladores pobres de las zonas rurales. Sin embargo, el inadecuado uso de esas sustancias químicas puede redundar en la degradación del suelo, en producir intoxicaciones agudas, afecciones crónicas, e incluso en la muerte. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que, cada año, cerca de 50.000 niños menores de 14 años mueren debido a intoxicaciones accidentales y no intencionales.

Los estudios realizados muestran que incluso dosis bajas de plaguicidas organofosforados, afectan el desarrollo del sistema nervioso y el cerebro de niños en crecimiento.^{5,6}

Teniendo en cuenta los alarmantes descubrimientos de los riesgos ambientales del uso de plaguicidas, en los años 60 surgió el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos. Desde ese momento a nivel mundial se han implementado programas de vigilancia y monitoreo de niveles residuales de plaguicidas en alimentos.

En contraste con otros contaminantes, la entrada de los plaguicidas en el ambiente ocurre bajo condiciones controladas siempre y cuando se sigan las buenas prácticas agrícolas. Este término se aplica al uso de plaguicidas bajo las condiciones aprobadas a nivel nacional e internacional, las cuales garantizan el control efectivo y real de las plagas, y a su vez los residuos que permanecen en el ambiente no producen efectos colaterales.^{7,8,9}

Sin embargo cuando no se siguen estas condiciones, se presentan efectos perjudiciales para el ambiente y para las especies expuestas.

Para determinar los efectos de los plaguicidas sobre la preparación normal de muchos alimentos, un comité de la Academia Nacional de Ciencia de los Estados Unidos (NAS) delegó a la EPA establecer la tolerancia para recién nacidos y niños

pequeños (Moffat, 1999). Al respecto el EWG (Environmental Work Group) encontró en sus estudios que: en las provisiones alimenticias de los Estados Unidos el 13% de las manzanas, el 7% de las peras y el 5% de las uvas contienen plaguicidas, por lo que expone al niño promedio al comer estas frutas a niveles inseguros de plaguicidas organofosforados. También se encontró que todos los días, 9 de cada 10 niños americanos, entre seis meses y cinco años, son expuestos a combinaciones de 13 insecticidas neurotóxicos diferentes en los alimentos que consumen.^{10,11}

El análisis de más de 80.000 muestras de alimentos examinados por el gobierno federal (en sus departamentos FDA y FAO), para la determinación de residuos de plaguicidas de 1991 hasta 1996, revelan que se encontraron 13 insecticidas organofosforados. Los plaguicidas organofosforados que presentan mayores riesgos son: metil paratión, dimetoato, clorpirifos, metil pirimifos y metil azinfos; los cuales representan más del 90% del riesgo total de los plaguicidas organofosforados en la dieta de infantes y niños (EWG, 1993, 1998).

El NRC (National Residues Committee) en un estudio preliminar probó 24 plaguicidas comunes en 17 tipos de frutas y verduras crudas. De 243 muestras, 97 (40%) contienen residuos por encima del límite de detección. Después del procesamiento normal este número se reduce a 47 (19%), mostrando una reducción significativa de los residuos (NCR 1992,1993; Lu *et al.*, 2001). Muchos procedimientos de procesado o cocción inician con la remoción de la superficie externa del producto una disminución de su presencia. Estas operaciones usualmente resultan en la reducción substancial de residuos (frecuentemente por un orden de magnitud), especialmente cuando los plaguicidas fueron aplicados directamente en el cultivo (pre o pos-cosecha); la mayoría de insecticidas y fungicidas solamente sufren movimientos muy limitados o penetración a través de la cutícula. Los residuos de plaguicidas no sistémicos en las frutas cítricas, bananas, melones, piñas, kiwis y cultivos similares son eliminados casi completamente mediante el pelado.^{12,13,14,15,16}

Sin embargo, algunos cultivos mayores como manzanas y tomates pueden ser consumidos intactos, así que no hay reducción de los residuos.

El pelado y cortado obtenido como subproducto de las operaciones comerciales puede contener residuos significativamente más altos comparados con la mercancía original intacta. Este factor debe ser tomado en cuenta en términos de posible bioacumulación de residuos lipofílicos en la cadena alimenticia, cuando estos

materiales son usados para la producción de otros productos alimenticios, alimentos para animales, o en el caso de cáscara de cítricos para obtener aceites esenciales.

Bajo ciertas condiciones (incluida la elaboración de los alimentos) algunos compuestos se pueden transformar en mutágenos o carcinógenos. El ejemplo más conocido es la formación de etilen tiourea (ETU) de etilen-bisditiocarbamatos (EBDCs), los cuales son usados contra hongos patogénicos que atacan las cosechas. Muchos productos de degradación son relativamente persistentes y pueden ser considerados contaminantes de los recursos ambientales.^{17,18}

Por ello es muy importante la determinación de los plaguicidas, en este caso la de los organofosforados, en uvas y manzanas porque estas frutas son de gran uso en las loncheras de los niños principalmente, pudiendo originar intoxicaciones crónicas.

1.2. Formulación del Problema.

¿La concentración de residuos de plaguicidas organofosforados en uvas y manzanas sobrepasa el límite residual máximo (LMR) establecido por la FAO y OMS?

1.3. Justificación Teórica.

Entre los efectos de los plaguicidas organofosforados sobre la salud, se cuentan las alteraciones neurológicas, reproductivas, endocrinas, inmunológicas y diversos tipos de cáncer como los tumores cerebrales, el cáncer de pulmón, el de ovario y el de próstata. Un numeroso conjunto de plaguicidas se encuentra entre las sustancias clasificadas como carcinógenas por la IARC, Internacional Agency for Research on Cancer, agencia dependiente de la Organización Mundial de la Salud.

De acuerdo con los informes anuales de la EFSA (European Food Safety Authority) correspondientes a los años 2007 y 2008 los porcentajes de muestras de diferentes frutas y hortalizas producidas en la Unión Europea contenían residuos detectables de al menos un pesticida y estos son: Mandarinas 79,8%, Naranjas 69,2%, Fresas 66%, Manzanas 60,9%, Peras 59,2%, Melocotones 47,1%, Lechuga 44,9%, Pepinos 30,8%, Avena 21,3%, Centeno 22,8%, Patatas 22,5%, Tomates 21,5%, Espinacas 21,5%, Repollo 19,1%, Arroz 16,3%, Zanahorias 15,5%, Judías 8,9%.

De acuerdo con el informe del USDA (United States Department of Agriculture) correspondiente al año 2009 los porcentajes de muestras de diferentes frutas y hortalizas producidas en EEUU que contenían residuos detectables de al menos un pesticida son los siguientes: Manzanas 97,7%, Uvas 97,2%, Fresas 95,7%, Cilantro 94%, Patatas 92,3%, Naranjas 91,8%, Espinacas 90,5%, Pepinos 84,9%, Peras 79,5%, Espárragos 9,9%, Maíz dulce (fresco) 0,1% ^{12,13,19,20,21}

Por ello es de gran importancia teórica y social el conocer científicamente la existencia de residuos tóxicos (plaguicidas organofosforados) en la uva y manzana provenientes de los distritos de Calango y Las Flores del valle de Cañete, porque representan un problema de Salud Pública, ya que estas frutas son consumidas con frecuencia por estar presente en la dieta del peruano de a pie y sobre todo por los niños que lo llevan en sus loncheras, siendo estos últimos los más lábiles por no tener completo sus sistemas de defensa. Por lo cual la presente investigación tiene como fin identificar los residuos tóxicos (plaguicidas) de estas frutas del valle de Cañete, para así dar a conocer a las autoridades de dicha provincia, y a los agricultores que hacen uso de estos plaguicidas de los riesgos y perjuicios a la salud que pueden generar por su mal uso. Así mismo esta investigación será un gran aporte a la bibliografía de la realidad agronómica del Perú. ^{12,13,14,15,16}

1.4. Justificación Práctica.

Es de gran importancia realizar las determinaciones de residuos de plaguicidas organofosforados por métodos altamente específicos y sensibles como lo es la cromatografía de gases acoplada al espectrofotómetro de masa, de acuerdo a la metodología de la AOAC, que es una técnica validada a nivel internacional ya que estas sustancias se encuentran muchas veces en el orden de trazas. ^{22,23,24}

Ello nos dará a conocer la contaminación de la uva y manzana con plaguicidas organofosforados, sustancias altamente peligrosas. Así mismo se evaluará, a través de encuestas, si los agricultores están realizando un buen uso de estos plaguicidas y la presencia de intoxicaciones por los síntomas que presentan.

1.5. Objetivos.

1.5.1. Objetivo General

Evaluar el uso de los plaguicidas órganofosforados por los agricultores de Calango y Las Flores (Mala) y su presencia en manzanas y uvas.

1.5.2. Objetivos Específicos.

- Identificar y cuantificar la presencia de plaguicidas organofosforados en manzanas provenientes de los valles de Calango y Las Flores.
- Identificar y cuantificar la presencia de plaguicidas organofosforados en uvas provenientes de los valles de Calango y Las Flores.
- Determinar si los agricultores de los valles de Calango y Las Flores hacen uso de los equipos de protección personal y reciben información sobre el peligro por el uso de plaguicidas.

CAPITULO II: MARCO TEORICO

2.1. Marco Filosófico o Epistemológico de la Investigación.

El hombre cada vez necesita mayor cantidad de alimentos, sin embargo las plagas hacen que se pierdan un gran porcentaje. Por evolución de estas se ha tenido la necesidad y la obligación de actualizar las formas de proteger la producción agrícola y a los animales productivos y domésticos que son necesarios para su salud y bienestar. Y es ahí donde los plaguicidas han ocupado un lugar muy importante.

Los plaguicidas son insumos químicos peligrosos utilizados en la actividad agrícola del País, su impacto está asociado a cuadros degenerativos en la salud de los agricultores y consumidores y a efectos muy peligrosos en la salud de las madres gestantes que están asociado a mutaciones y efectos teratogénicos. Los plaguicidas lejos de resolver los problemas en el campo, más bien han contribuido a generar resistencia y al incremento de insectos plaga, así como al deterioro del suelo, significando además dependencia tecnológica.^{25,26,27}

Desde 1,990 la RAAA (Red de Acción en Agricultura Alternativa) ha promovido la investigación para el desarrollo de tecnologías agroecológicas, a nivel nacional, orientando a la búsqueda de alternativas que permitan reducir el uso de plaguicidas y promover una producción limpia para una alimentación sana, y de modo permanente ha contribuido al desarrollo de capacidades en agricultores.

Las investigaciones realizadas en el país, registran el nivel de uso y aplicación de plaguicidas, así como las dificultades que tienen los agricultores para su manejo comprobándose casos de intoxicación y muerte a consecuencia de su mal uso. Los trabajos realizados demuestran que los plaguicidas han generado resistencia de los organismos plaga, encontrándose presentes en las cadenas tróficas, afectando a los consumidores e incluso a los componentes de la fauna silvestre.^{3,22,28}

Los resultados de las investigaciones y las innovaciones realizadas en el campo a partir de su implementación, nos permiten hacer propuestas con fundamento sobre determinadas normas, como la Ley de Prohibición de Plaguicidas, Restricciones en el Uso de Plaguicidas de extremada y altamente peligrosos, la Ley de Manejo Integrado de Plagas (MIP), la Ley de Agricultura Orgánica, la Ley de Eliminación de Plaguicidas de la Docena Sucia, la Ley de Pos Registro de Plaguicidas y la Ley de Biotecnología Moderna (transgénicos).^{29,30,31}

2.2. Antecedentes de Investigación.

En el Perú la Mosca de la Fruta (*Ceratitis capitata* wied) y los cocidos o cochinillas, se han convertido en plagas importantes que hace posible el abuso de plaguicidas efectivos que tengan mayor efectividad para poder obtener una mayor producción de los cultivos de frutas.

Por eso se han realizado diferentes trabajos como:

- VALDIVIEZO, A., Que determinó residuos de plaguicidas organofosforados en vegetales de consumo directo.²⁵
- MURCIA, A; STASHENKO, E. En la investigación “Determinación de plaguicidas organofosforados en vegetales producidos en Colombia” observaron que el total de las muestras analizadas (35), contiene residuos de más de dos plaguicidas organofosforados (el 6 % de las muestras contiene residuos de 2 plaguicidas, el 17 % de 3, el 20 % de 4, el 46% de 5 y el 11 % de 6); además que el plaguicida profenofos excede el MRL (Límite Máximo Residual) en más del 50 % de los casos. Colombia-2008.⁴⁶
- CAMPOS, C; PALACIOS, A. En la investigación “Determinación por HPLC de residuos de insecticida organofosforados (methamidophos) en tomates comercializados en Lima-Perú” concluyeron que las muestras de tomates analizados presentan en un 100% residuos de Methamidophos, el 4% de las muestras analizados tiene una concentración de 1,0369 ppm que supera el LMR de 1.00 ppm para tomates según el Codex Alimentarius. El valor promedio de residuos de Methamidophos en las muestras de tomates analizados es 0.7122 ppm que superan la media del LMR (0,50 ppm).²²

- RAMÍREZ, L. En la investigación “Determinación de pesticidas en vegetales mediante cromatografía de gases espectrometría de masa/masa (GC-MS/MS)” concluye que el uso de acetato de etilo permitió la extracción de pesticidas organofosforados (malatión y metamidofos), organoclorados (alfa-endosulfán) y dicarboxiimidas (tetrahidro-ftalimida) de los vegetales estudiados.³²
- PÉREZ, A; SEGURA, A; GARCIA, R Et. En la investigación “Residuos de plaguicidas organofosforados en cabezuela de brócoli (*Brassica oleracea*) determinados por cromatografía de gases” concluyeron que la alta incidencia de *Brevicoryne brassicae*, *Trichoplusia ni*, *Copitarsia consueta*, *Artogeia rapae*, *Trialeurodes* sp y *Bermisia tabaci*, reportadas por los productores como las principales plagas en el cultivo de brócoli en Mixquic, con una frecuencia de 82.5, 80, 80, 70 y 37.7 % respectivamente, hace necesaria una serie de aplicaciones de productos químicos para su control, donde los plaguicidas organofosforados constituyen tratamientos clásicos.³³
- AQUINO, M; CASTRO, C. En la investigación “Análisis de residuo de plaguicida organofosforado (Methamidophos) en muestras de papa de mercados de Lima Metropolitana” determinaron la presencia de residuo de plaguicida organofosforado methamidophos en todas las muestras analizadas en una concentración máxima de 2,7055 ppm; superando el Límite Máximo Residual establecido por el *Codex Alimentarius* que es de 0,05 ppm de dicho plaguicida en muestras de papa.²⁷

No habiéndose encontrado estudios de evaluación de plaguicidas organofosforados en manzanas y uvas en la zona de Calango y Santa Cruz de Flores, por lo que se propone el presente trabajo.

2.3. Bases Teóricas.

2.3.1. Plaguicidas.

Los plaguicidas son sustancias químicas utilizadas para controlar, prevenir o destruir las plagas que afectan a las plantaciones agrícolas. La mayoría de estas sustancias son fabricadas por el hombre, por eso son llamados plaguicidas sintéticos. La producción de estas sustancias surge a partir de la Segunda Guerra Mundial, donde los países industrializados inician la fabricación de plaguicidas con carácter comercial con el fin de aumentar la producción agrícola.

Uno de los primeros plaguicidas y más comunes fue el DDT, para combatir las plagas en la agricultura y los mosquitos transmisores de malaria. En la actualidad existen grandes cantidades de marcas de plaguicidas en el mundo.

Para evitar la toxicidad de estos plaguicidas se creó el Límite Máximo Residual (LMR) que se define como el límite legal permitido de residuos de plaguicidas (expresado en mg/kg de producto) que puede permanecer en los alimentos y en el forraje para animales. También se creó la Ingesta Diaria Admisible (IDA) que es la cantidad máxima diaria de producto químico que se puede ingerir durante la vida de una persona sin que suponga un riesgo apreciable para su salud. A pesar que el establecimiento de estos criterios comunes internacionales para determinar los valores de los LMR tiene como objetivo facilitar y asegurar el comercio internacional, a menudo se dan ligeras variaciones entre las referencias nacionales y las recomendaciones internacionales. Respecto a esto, los países miembros propusieron armonizar con otros países miembros, los LMRs de productos fitosanitarios permitidos en alimentos de origen animal y vegetal, de forma que si un LMR no se especifica en concreto se establecerá un valor general por defecto de 0.01 mg/kg. Con estos valores se pretende asegurar un valor de IDA lo suficientemente restrictivo para evitar perjuicios en la salud de los consumidores, especialmente para los bebés y niños.^{30,34,35,36}

Actualmente, hay pruebas abrumadoras de importantes contaminaciones en alimentos agrícolas, en frutas, vegetales entre otros y medioambientales en aguas,

sedimentos, mamíferos, peces, etc. Así como graves efectos para la salud, tales como afecciones del sistema nervioso, trastornos reproductivos y del desarrollo de cáncer, problemas genéticos, a causa del uso de plaguicidas, tanto en el ámbito agrícola como en otros campos de aplicación. Gracias a los esfuerzos de investigadores destinados al desarrollo de nuevos plaguicidas, se ha conseguido sustituir muchos de los productos altamente tóxicos, persistentes y bioacumulativos (en su mayoría compuestos organofosforados prohibidos como el malatión y paratión y organoclorados en los países desarrollados desde hace años) y de compuestos carbámicos como el aldicarb, metomilo, carbofurano, propoxur y carbaryl entre otros, por plaguicidas que se degradan más rápidamente en el medio ambiente y menos tóxicos para los organismos a los que no están destinados. Pese a ello, en los países en vías de desarrollo, algunos de los productos fitosanitarios más antiguos continúan siendo los más baratos de producir y, para algunos fines, continúan siendo muy eficaces (p.e. los pesticidas organofosforados y carbámicos de estudio en este trabajo), por lo que no se han llegado a prohibir.^{27,37,38}

La disyuntiva entre costo/eficacia e impacto ecológico, incluidos los efectos a larga distancia debidos al transporte atmosférico y el acceso a las formulaciones con materias activas más modernas a bajo precio, constituye un problema de alcance en nuestro país y mundialmente. Es muy importante a la hora de evaluar los efectos sobre el medio ambiente el considerar no sólo los que se producen en el lugar de aplicación, sino también en los lugares alejados. En este sentido, algunos plaguicidas, son prohibidos a altas concentraciones en productos agrícolas, en los países desarrollados (malatión, paratión, metamidofos, aldicarb, metomilo, carbofurano, propoxur, carbaryl, etc.) y que son usados indiscriminadamente especialmente en nuestro país. La mayor concientización social lograda a través del conocimiento de los potenciales peligros asociados al combinar su uso masivo y toxicidad, junto con la disponibilidad de cada vez más datos sobre su presencia en muestras, tanto en alimentos, muestras ambientales como biológicas, hace que el control de estas sustancias empiece a cobrar la importancia que merece tanto para la comunidad científica como para los gobiernos.^{6,21,22,}

En este sentido, se han publicado durante los últimos tiempos muchos artículos científicos relacionados con los plaguicidas, tanto relativos a su presencia en todo tipo de muestras como a sus riesgos y efectos sobre el medioambiente y la salud. Además, tanto en la pasada década como en ésta, los países europeos han legislado

mucho con objeto de establecer parámetros restrictivos en cuanto a concentraciones máximas permisibles (p.e LMRs niveles máximos permisibles en frutas, vegetales, agua ,etc.), así como guías sobre calidad de los análisis (Directiva 2002/657/CE, SANCO/10684/2009 a nivel europeo) y en nuestro país la entidad especialista de legislar es SENASA, pero a la falta de normatividad en frutos nativos se realiza el presente trabajo. Por ende la determinación de plaguicidas, así como de otros tipos de contaminantes orgánicos, en matrices de distinta naturaleza satisfaciendo las estrictas restricciones establecidas en la legislación, son necesarios indicando métodos analíticos altamente sensibles y específicos capaces de reportar de manera fiable valores de concentraciones a niveles de ppm o sub-ppm. Con el fin de poder ser utilizados en programas de control, estos métodos deben ser rápidos para poder analizar el mayor número de muestras consumiendo el menor tiempo posible.^{25, 29}

2.3.2. Determinación de Residuos de Plaguicidas en Muestras de Frutas.

Como se ha comentado anteriormente, la presencia de plaguicidas en frutas pueden presentar un riesgo para la salud de los consumidores. A su vez, a nivel de comercio internacional se deben tomar decisiones importantes en función de los resultados obtenidos en estudios de análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos. La calidad y fiabilidad de los análisis deben ser un punto muy importante en el desarrollo del método así como en la selección de la técnica analítica, ya que la presencia de errores en los resultados presentados pueden generar muchos costes por pérdidas de cosechas enteras o pérdidas económicas derivadas de litigios entre empresas. Por todas estas razones, se deben disponer de métodos de análisis adecuados a las necesidades de la realidad del problema analítico en cada caso. El uso de los nuevos avances instrumentales en química analítica se presenta como una herramienta adecuada y muy útil para afrontar la problemática del análisis de plaguicidas en muestras de alimentos. Desde el punto de vista analítico es muy importante establecer unos criterios de elección del método analítico, así como la técnica analítica que mejor se ajuste a las necesidades del problema analítico que se desea afrontar. Tradicionalmente, se ha utilizado tanto la cromatografía líquida (*Liquid Chromatography*, LC) acoplada a detectores de ultravioleta (UV; *Diode*

Array Detector, DAD) y fluorescencia (*Fluorescence Detector*, FD) para plaguicidas de alta polaridad o inestabilidad térmica; y la cromatografía de gases (*Gas Chromatography*, GC) acoplada a detectores de captura de electrones (*Electron Capture Detector*, ECD), detectores específicos de fósforo o nitrógeno (*Nitrogen Phosphorous Detector*, NPD) o espectrómetro de masas (*Mass Spectrometry*, MS), para el análisis de plaguicidas más apolares, con cierta estabilidad térmica y volatilidad. De ellas, la técnica que se ha aplicado más ampliamente ha sido GC-MS debido a su buena sensibilidad y selectividad. Sin embargo, el desarrollo de nuevas interfases capaces de acoplar la técnica separativa LC a la MS, ha permitido su implantación progresiva en el campo del análisis de residuos de plaguicidas, llegando a alcanzar el mismo *status* de aplicación que la técnica GC-MS, especialmente porque en las últimas décadas la industria de los fitosanitarios se ha decantado más hacia el desarrollo de plaguicidas más polares e inestables térmicamente (Soler *et al.*, 2008). La visión actual desarrollada de la metodología de análisis LC acoplado a MS en tándem (MS/MS), así como su aplicación en el estudio de plaguicidas se expondrá con mayor profundidad más adelante, dedicados a los instrumentos LC acoplados a triple cuadrupolo (*Triple Quadrupole*, QqQ).^{23,39,40,41,42}

2.3.3. Peligros para la Salud de los Plaguicidas Organofosforados

La mayoría de los plaguicidas organofosforados que se utilizan actualmente, no han sido sometidos a pruebas de toxicidad adecuadas. Esto es especialmente cierto en cuanto a la neurotoxicidad, que es el efecto más grave que pueden tener estos compuestos. Aun cuando los plaguicidas organofosforados han sido probados para ver su neurotoxicidad, se ha encontrado que se dan diferencias notables, en cuanto a toxicidad, entre las diferentes especies animales. Por lo tanto, la neurotoxicidad en los humanos es difícil de predecir con los experimentos en animales. Actualmente estos plaguicidas se usan sin el conocimiento adecuado sobre los efectos en la salud humana.

Además, los compuestos organofosforados para uso agrícola se encuentran en el aire, en los sistemas de agua, los suelos y en los alimentos, por lo que sus efectos en la salud de la población en general se desconocen.^{2,7,25}

Envenenamiento agudo

Los plaguicidas organofosforados son responsables de causar una gran cantidad de casos de envenenamientos agudos y algunas muertes cada año entre los agricultores principalmente. Los efectos en la salud como el envenenamiento son causados por la inhibición de una enzima llamada acetilcolinesterasa. Esta enzima tiene un papel importante en la transmisión de los impulsos nerviosos. Cuando la acción normal de esta enzima se bloquea por estos compuestos, se vuelve imposible que se "apaguen" los impulsos nerviosos. Esto resulta en una cantidad de características de síntomas adversos y en casos severos de fallas respiratorias o cardíacas que pueden llevar a la muerte. El envenenamiento agudo puede tratarse con drogas y el paciente generalmente se recupera en unos días. Sin embargo, no existe evidencia de que el envenenamiento agudo por plaguicidas organofosforado pueda tener efectos a largo plazo en el sistema nervioso.^{5,43,44}

Efectos crónicos en el sistema nervioso

Estudios recientes de hechos en individuos que están expuestos ocupacionalmente a los plaguicidas organofosforados sugieren que tanto la exposición aguda como la larga pueden causar efectos crónicos tanto en el sistema nervioso periférico como en el central. Actualmente, el número de personas afectadas por tal neurotoxicidad no se conoce, pero los estudios indican que el problema podría ser muy extenso.⁴⁵

Daños al sistema nervioso periférico

Los casos graves de envenenamiento agudo pueden causar daño a largo plazo al sistema nervioso periférico conocido como neuropatía retardada inducida por organofosfatos (organophosphate-induced delayed neuropathy -OPIDN). Los síntomas incluyen dolor muscular y debilidad, comezón/ardor que comienza en las manos y pies y eventualmente puede progresar hacia otros miembros. Debido a que los síntomas comienzan en las extremidades, al daño nervioso se le denomina como "distal" (p. e.: degeneración zonal distal). Si el daño a los nervios es extenso, puede ocurrir una parálisis. El número de personas reportadas que sufren de OPIDN es relativamente pequeño. Aun así, estudios recientes sugieren que muchos individuos que están expuestos ocupacionalmente a estos plaguicidas pueden sufrir daño al sistema nervioso periférico -tanto de incidentes de envenenamiento agudo o después de exposiciones repetidas en pequeña cantidades. Por ejemplo:

Intoxicación aguda - Pruebas en las manos y pies de personas que han experimentado previamente un solo caso de envenenamiento agudo por metamidofos, mostraron crónico deterioro sensorial y síntomas de OPIDN.^{44, 45}

Exposición crónica - Estudios recientes sugieren que la exposición repetida a cantidades pequeñas, sin episodios de envenenamiento agudo, puede causar OPIDN. Tales exposiciones repetidas pueden causar daño acumulativo a los nervios. Estudios realizados en granjeros ingleses que utilizan OP para bañar a las ovejas (con un contenido de plaguicidas OP - diazinon, clorfenvinfos o propentafos) muestran que los síntomas reportados por los granjeros son característicos de daño del nervio periférico. Además, las pruebas hechas en dieciséis granjeros que estuvieron involucrados en baños de ovejas por cuatro años o más, revelaron que todos ellos tenían daños en el nervio periférico en la forma de distal axonopatía, característica del OPIDN. Los plaguicidas usados en Inglaterra para estas actividades, son los mismos usados en los cultivos del Mediterráneo.

Daños al sistema nervioso central

Tanto la intoxicación aguda de OP como la exposición crónica a los plaguicidas OP pueden resultar en daño al sistema nervioso central a largo plazo, que involucra cambios en la función del cerebro. Los síntomas incluyen depresión, ansiedad, somnolencia, mareo, fatiga, problemas para hablar y confusión mental.

Envenenamiento agudo - Existe evidencia concluyente de que este envenenamiento puede causar, a largo plazo, efectos adversos en la función del cerebro. Este puede deberse a la falta de suministro de oxígeno al cerebro, que durante un episodio de envenenamiento afecta al corazón y sistema respiratorio.

Un estudio reciente, que realizó pruebas en personas a dos años de haber sufrido un solo episodio de envenenamiento agudo de OP, mostró que tenían una sutil -aunque clínicamente significativa- disminución en el funcionamiento neuropsicológico.

Exposición crónica - Estudios recientes han demostrado que la exposición consecutiva a pequeñas cantidades de plaguicidas OP puede causar efectos adversos

en el cerebro a largo plazo. Más de una tercera parte de los granjeros ingleses sobre los que se hicieron estudios, sufrían de efectos similares en el sistema nervioso central provocados por la intoxicación de OP incluyendo fatiga, pérdida de la concentración y depresión.

Además, un estudio epidemiológico de la Organización Mundial de la Salud sobre los "trabajadores sanos" que estuvieron expuestos crónicamente a plaguicidas OP en sus trabajos en varios países europeos, revelaron que estas personas generalmente obtuvieron menos puntos en las pruebas de comportamiento nervioso: bienestar y estado de ánimo (p. e. ansiedad, depresión, irritabilidad). Por lo tanto, los síntomas de sentirse menos bien y tener problemas de estado de ánimo en los trabajadores, estuvieron relacionados a la exposición ocupacional de plaguicidas.^{46,47,48}

2.3.4. Los Plaguicidas y el Cáncer.

Cáncer. Estudios epidemiológicos han reportado que la exposición a estos plaguicidas está asociada con un riesgo de aumento en una cantidad de cánceres incluyendo, cáncer de estómago, de pulmones, de vejiga y linfoma.

El cáncer es una enfermedad que se expresa en el crecimiento de un tumor maligno, es decir, un crecimiento anormal, desordenado y potencialmente ilimitado de las células de un tejido o un órgano. También se le conoce como neoplasia maligno y puede llevar a la muerte del paciente.

El tiempo que tarda en desarrollarse un cáncer depende del tipo de cáncer y la edad de la persona. En adultos toma de diez a quince años o más. En niños toma mucho menos. Algunas clases de cáncer comienzan a desarrollarse incluso antes de nacer, cuando el niño se encuentra dentro de la madre.

Hay tres mecanismos por medio de los cuales los plaguicidas contribuyen a la generación de cáncer:

a) causando efectos genotóxicos, es decir cambios directos en el material genético o ADN.

- b) siendo promotores del cáncer, causando la fijación y proliferación de grupos de células anormales. Este proceso puede incluir efectos hormonales que pudieran estimular la sensibilidad en ciertas células a los carcinógenos, y
- c) debilitando el sistema inmunológico en la vigilancia que el cuerpo realiza de sustancias invasoras carcinógenas. No todos los plaguicidas provocan cáncer aunque un sólo plaguicida puede desarrollar más de un mecanismo que genera esta enfermedad.

Las tres líneas más importantes de evidencia que relacionan ciertos tipos de cáncer con la exposición a los plaguicidas son los estudios de cultivo de células en laboratorio, que demuestran los cambios en los cromosomas o estrógenos; los estudios en animales de laboratorio y los estudios epidemiológicos en poblaciones humanas.

Es difícil probar en humanos una relación causal directa entre un plaguicida específico y un tipo de cáncer, ya que son diversas las sustancias cancerígenas a las que estamos expuestos en nuestra vida, trabajo, ocupación o lugar de residencia; sin embargo, hay diversos estudios epidemiológicos ocupacionales en agricultores, trabajadores industriales, en residentes o consumidores, en los cuales se ha probado cierta relación entre diversos tipos de cáncer y la exposición a plaguicidas.

Tipos de cáncer relacionados con plaguicidas:

| | |
|--|--|
| Enfermedades malignas de la sangre que provocan cánceres en la edad adulta | Linfoma no-Hodgkin[2], cáncer en la médula ósea (mieloma múltiple), leucemia mieloide, síndrome mielodisplástico, sarcomas en tejido blando |
| Carcinomas y tumores malignos en el sistema nervioso central | Cáncer de la piel y cáncer del labio, tumores cerebrales, cáncer del tracto respiratorio, cáncer gastrointestinal, cáncer del tracto urinario, cáncer en los testículos, cáncer en la próstata, cáncer de pecho, cáncer en la tiroides |
| Tumores malignos en niños | Leucemia infantil, linfoma no-Hodgkin, tumores cerebrales y en el sistema nervioso, sarcomas, tumor de Wilm |

Fuente: Adaptado del reporte de Gina Solomon *et al. Pesticides and Human Health. A resource Guide for Health Care Professionals*, Physicians for Social Responsibility, Californian for Pesticide Reform, San Francisco CA., 2000. Capítulo 4, "Pesticides and Cáncer".

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) está en proceso de clasificar los plaguicidas según puedan o no causar cáncer. La clasificación se basa en estudios con animales de laboratorio y hasta el momento ha evaluado 250 plaguicidas.^{7,36,45,46}

Doce plaguicidas de mayor uso en Estados Unidos están clasificados por la EPA como posibles o probables carcinógenos (atrazina, metolaclor, metam sodio, dicloropropeno, cianazina, pendimetalin, trifluralina, acetoclor, clorotalonil, mancozeb, fluometuron y paratión) con un uso anual de poco más de 190 mil ton. La mayoría de los cuales están autorizados también en muchos países.

Estudios epidemiológicos han encontrado relación entre el incremento de la exposición a cuatro plaguicidas frecuentemente usados (atrazina, 2,4-D, glifosato y diazinon) con un incremento en el riesgo de contraer cáncer (no-Hodgkin linfoma, de ovario, cáncer de pecho, cáncer cerebral y leucemia). Todos ellos herbicidas e insecticidas autorizados en la mayoría de países.

Los herbicidas que han recibido más atención pertenecen al grupo de las triazinas: cianazina, simazina y atrazina, clasificadas como posibles carcinógenos en humanos; están sujetas a investigaciones especiales para probar su posible rol en el desarrollo de cánceres de ovario y pecho.

Como se puede apreciar en el cuadro en México están autorizados 75 plaguicidas conocidos o sospechosos de causar cáncer en humanos, que han sido identificados por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer, por la EPA, o por la Unión Europea. Cada uno de estos ingredientes activos tiene numerosos nombres comerciales. Algunas sustancias enlistadas como ingredientes activos, como las sales de sodio y el ortofenil fenol, se usan como "ingredientes inertes" en formulaciones de plaguicidas.

Enfermedad Saku - Desde 1965, se ha reportado que al rociar las áreas de cultivos con plaguicidas OP en Japón causa efectos adversos en el ojo, se le dio el término de la enfermedad del Saku, en poblaciones que habitan cerca de estas áreas. Los síntomas incluyen miopía y los niños en particular se han visto afectados.

Defectos de Nacimiento - Los experimentos han mostrado que los compuestos OP causan efectos tóxicos en los fetos en desarrollo resultando en defectos de nacimiento. La evidencia limitada sugiere que los defectos de nacimiento pueden ocurrir en los humanos después de estar expuestos a los OP.

Inmunotoxicidad - Los experimentos en animales han mostrado que algunos plaguicidas OP son tóxicos para el sistema inmunológico y en particular, causan reacciones alérgicas. Se reportó que la aplicación aérea de malatión en los Estados Unidos, causa reacciones alérgicas en la gente. Los experimentos en ratones apoyan este fenómeno mostrando que el malatión es tóxico para las células del sistema inmunológico que causa reacciones alérgicas a niveles extremadamente bajos.^{7,45,49}

Efectos sobre la población en general

En el caso de inmunotoxicidad, la Enfermedad de Saku y neurotoxicidad, es posible que la población en general pueda verse afectada por el esparcimiento aéreo de los plaguicidas OP. Los efectos similares de la población en general pueden también ocurrir al exponerse a los residuos de OP en los alimentos.

Sin embargo, en la región del Mediterráneo es poco frecuente el monitoreo de residuos de plaguicidas OP en la comida, pero estudios recientes han encontrado contaminación por dichas sustancias en frutas y verduras. Un estudio detectó niveles de estos plaguicidas más altos que aquellos permitidos por la ley italiana en 48% de naranjas sicilianas que se estaban vendiendo en Boloña, Italia.

Por lo tanto, además de la salud de las personas expuestas ocupacionalmente, la salud de la población en general puede verse afectada por la exposición de estos plaguicidas. Actualmente, la extensión de los efectos en la salud de la población en general por la exposición a estos plaguicidas altamente tóxicos, se desconoce y debería de ser de gran preocupación.^{43,44}

2.3.5. Provincia de Cañete

La provincia de Cañete se divide en los siguientes Distritos: Asia, Calango, Cerro Azul, Chilca, Coayllo, Imperial, Lunahuaná, Mala, Nuevo Imperial, Pacarán, Quilmaná, San Antonio, San Luis, San Vicente de Cañete, Santa Cruz de Flores,



2.3.5.1. Distrito de Santa Cruz de Flores



Historia

Ubicada a una hora al sur de la ciudad capital de Lima, fue creado como distrito mediante Ley No. 4611 del 27 de diciembre de 1922.

Es uno de los distritos cañetanos con mayores atractivos en sus paisajes, ambientes campestres y fértiles tierras productora de una diversidad de frutas. Un buen ejemplo es el caserío de San Vicente de Azpitía, llamado el "Balcón del cielo", pues desde allí se tiene una buena vista del valle de Mala, se caracteriza por su excepcional producción vitivinícola.

Ubicación Geográfica

El distrito de Santa Cruz de Flores se encuentra en el Departamento de Lima, Provincia de Cañete, al Sur de la Capital altura del km. 82 de la Panamericana Sur, sobre los 85 m.s.n.m.

Límites:

Por el Este: Distrito de Calango.

Por el Oeste: Distrito de San Antonio.

Por el Norte: Distrito de Chilca.

Por el Sur: Distrito de Mala.

Fecha y Número de Ley de Creación:

27 de Diciembre de 1922.

Ley N° 4611.

Extensión:

100.06 km².

2.3.5.2. Distrito de Calango.



Historia

Este distrito tiene una larga historia ancestral que data desde la época Pre-inca. Testigo mudo de ello son los restos arqueológicos que hasta hoy podemos vislumbrar Yuncavirí y La Vuelta. Posteriormente a la llegada de los españoles a esas tierras, se crean las encomiendas, en donde los partidarios del conquistador Pizarro fueron los más favorecidos. Por ello, la encomienda de Calango fue destinado al español Pedro de Navarra. Con la llegada de la vida republicana, el pueblo de Calango pasó a conformar el distrito de Chilca hasta el 04 de Noviembre de 1887, fecha en que por ley dada por el entonces Presidente de la República Don Andrés Avelino Cáceres, eleva a la categoría de distrito al progresista pueblo de Calango. De acuerdo el considerando de la misma ley, razones de distancia hacia Chilca, determinaron esa creación ocurrida en los años siguientes de la culminación de la Guerra del Pacífico.

En la actualidad, un busto de Cáceres erigido en la Plaza de Armas de Calango, perenniza ese acontecimiento.

Calango fue creado como distrito el 4 de noviembre de 1887, siendo entonces presidente del Perú Andrés Avelino Cáceres, ya que antes pertenecía al distrito de Chilca. Tiene una población superior a los 2 200 habitantes.

Ubicación Geográfica

El pueblo de Calango se ubica partiendo de Mala por una carretera asfaltada de 24 km a orillas del río Mala. En la Plaza de Armas destaca una iglesia amarilla, las casas son casi todas de adobe y de un solo piso. Cuando se pasea por los campos, lo que más se distingue son las chacras rebosantes de todo tipo de frutas, en especial la manzana. La patrona del pueblo es la Virgen de la Candelaria.

Límites:

Por el Este: Provincia de Yauyos.

Por el Oeste: Distrito de Mala y Sta. Cruz de Flores.

Por el Norte: Distrito de Chilca.

Por el Sur: Distrito de Coayllo.

Fecha y Número de Ley de Creación:

Ley, S/N, 04 Noviembre de 1887.

Extensión:

530.84 km².

Población.

Tiene una población superior a los 2 377 habitantes.

2.3.5.3. Manzana Delicia

La manzana delicia es principalmente cultivada en Calango (distrito que se ubica partiendo de Mala por una carretera afirmada de 24 km a orillas del río Mala) y el distrito de Santa Cruz de Las Flores. La provincia de Mala está vinculada a las actividades agrarias, dedicados a grandes cultivos frutícolas entre las que destaca el

cultivo de diversas variedades de manzana, donde destaca el cultivo de la manzana Delicia, siendo uno de los principales productores de esta fruta,

Zonas de cultivo

La manzana delicia es principalmente cultivada en Calango (distrito que se ubica partiendo de Mala por una carretera afirmada de 24 km a orillas del río Mala) .Esta provincia está vinculada actividades agrarias, dedicados a grandes cultivos frutícolas entre las que destaca el cultivo de diversas variedades de manzana, habiéndose convertido en el principal productor de esta fruta.

Características Generales

Denominación del bien : manzana delicia / manzana red delicious

Denominación técnica : manzana delicia / manzana red delicious

Unidad de medida : kilogramo (Kg.)

Descripción General : La manzana es el fruto del manzano (*Malus domestica*), árbol de la familia de las Rosáceas, comestible.

Características Técnicas

La manzana es el fruto del manzano (*Malus domestica*), árbol de la familia de las Rosáceas, contiene una fibra soluble, que ayuda al cuerpo a eliminar el colesterol y a protegerse contra los efectos de la polución ambiental, Las manzanas son ricas en pectina (buen aliada contra el colesterol y la diabetes), aminoácidos, ácidos, azúcares, fibras; son la especie frutal, a excepción de los cítricos, que se puede mantener durante más tiempo, conservando buena parte de su valor nutritivo.

Manzana Red Delicious, tiene piel o cáscara color rojo brillante, pulpa blanquecina, es algo arenosa y con un sabor algo ácido, de esta variedad procede la variedad Royal Red Delicious.

Características organolépticas

Forma: Este fruto tiene formatronco-cónica, con cinco lóbulos o protuberancias bien marcadas, a veces de forma algo irregular por deficiencias en la polinización Su piel es casi siempre brillante y lisa.

Color: Por lo general tiene piel (cáscara) color rojo brillante, y a veces tiene rayas y pulpa blanquecina amarillenta.

Tamaño y peso: El tamaño medio es de 160 a 240 gramos, 70 a 85 milímetros de calibre y una altura de 85-90 milímetros.

Sabor: Dulce, con casi nada de ácido, muy aromático y su pulpa suele ser blanda.

Composición Nutricional

La manzana delicia tiene la siguiente composición nutricional:

| Composición nutricional de 100 gramos | Manzana delicia |
|---------------------------------------|-----------------|
| Agua g | 84 |
| Calorías Kcal. | 59 |
| Carbohidratos g. | 15 |
| Proteínas g. | 0,19 |
| Fibras g. | 2.7 |
| Potasio mg. | 115 |
| Lípidos g. | 0,4 |
| Calcio mg. | 7 |
| Fósforo mg. | 7 |
| Magnesio mg | 5 |
| Azufre mg. | 5 |
| Hierro mg. | 0,18 |
| Vitamina B3 (Niacina) mg. | 0,17 |
| Vitamina E mg. | 0,4 |
| Vitamina A U.I. | 53 |



2.3.5.4. Uva Quebranta

Esta uva cuando proviene de los valles del sur peruano se caracteriza por tener un color oscuro y uniforme, mientras que cuando es plantada en Ica y Cañete, en un mismo racimo puede ser variopinta. Los piscos hechos con esta cepa pueden presentar aromas a manzana, plátano, melocotón, pasas negras, heno y lima.



La uva quebranta es una variedad que resulta de la mutación genética de la uva negra traída por los españoles a Perú, inducida por la adaptación de la planta (*Vitis vinifera*) a las condiciones ambientales de suelo pedregoso y del clima desértico propio de la

provincia de Pisco, que se extiende a los valles de los departamentos de Lima, Ica, Arequipa, Moquegua y algunos valles del Departamento de Tacna donde existen condiciones similares.

La uva quebranta es una variedad no aromática, de un gusto muy peculiar, que da el sabor inconfundible al aguardiente de uva Pisco. La uva quebranta es de baya casi redonda, hollejo duro y grueso. Generalmente es grande, aunque su tamaño y coloración dependen de diversos factores relacionados con su cultivo. Su pulpa es carnosa y dulce, pero un poco áspera al paladar. Puede considerarse como una variedad peruana por excelencia debido a que no guarda similitud con aquellas conocidas en otras partes del mundo.

Su rusticidad, producto de su aclimatación al suelo de los valles vitivinícolas de la costa sur del Perú, le ha permitido ser resistente al insecto de la filoxera. Se ha podido comprobar la presencia de nódulos y aún del insecto propiamente dicho en las raíces de la uva quebranta, pero sin que ello afecte en absoluto la producción de uva. Esta característica hace que las cepas de uva quebranta sirvan como porta injertos.

| Clasificación científica | |
|--------------------------------|----------------------|
| Reino: | <u>Plantae</u> |
| División: | <u>Magnoliophyta</u> |
| Clase: | <u>Magnoliopsida</u> |
| Orden: | Vitales |
| Familia: | <u>Vitaceae</u> |
| Género: | <u>Vitis</u> |
| Especie: | V. vinifera |
| Subespecie: | V. v. vinifera |
| Nombre binomial | |
| Vitis vinifera subsp. vinifera | |

CAPITULO III: METODOLOGIA

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Es de tipo descriptivo, prospectivo y longitudinal.

3.2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

Es una investigación de diseño experimental.

3.3. ÁMBITO DE ESTUDIO.

El trabajo consta de dos partes:

3.3.1. **El análisis químico toxicológico** de identificación y cuantificación de plaguicidas órgano fosforados en manzanas y uvas procedentes del valle de Calango y Las Flores de la Provincia de Cañete y

3.3.2. **El trabajo de campo** en la que a través de encuestas a los agricultores se evaluará el daño que está causando el uso de estos plaguicidas.

3.4. MUESTREO.

3.4.1. **Muestras de manzanas y uvas:** se tomaron 20 muestras: 10 muestras de manzanas deliciosas y 10 muestras de uva quebranta, de las cuales cinco eran de Calango y cinco de Las Flores.

3.4.2. **Encuestas:** se tomaron 20 encuestas a los agricultores, 10 en Calango y 10 en Las Flores.

3.5. MÉTODO DE QuEChERs

Fundamento

Es un método de ensayo que describe los pasos para la determinación de multiresiduos de plaguicidas en frutos y vegetales teniendo como referencia el AOAC Official Method 2007.01. "Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate", conocida comúnmente como método QuEChERs cuyo procedimiento consiste en la extracción de los plaguicidas con acetonitrilo en medio tamponado con ácido acético-acetato de sodio seguido de

una etapa de limpieza o clean-up combinada con amina primaria secundaria y sulfato de magnesio. Para el caso de matrices con alto contenido de pigmento o grasa se adiciona C18 o carbón grafitizado para finalmente ser analizados por LC/MS-MS (Cromatógrafo líquido acoplada con espectrómetro de masas en tandem y GC-MS (Cromatógrafo de gases acoplada a espectrómetro de masas).

El método se desarrolla a partir del método AOAC Official Method 2007.01, utilizando otros estándares internos de control de calidad. *El método ha sido verificado en los informes de verificación IVE-004-11 e IVE-004-13.*

3.5.1. Objetivo

El presente método permite describir las actividades para determinar multiresiduos de plaguicidas en frutos y vegetales mediante Cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas en tandem y Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

3.5.2. Campo de Aplicación

El método se aplica para la determinación de multiresiduos de plaguicidas en frutos y vegetales por Cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas en tandem y Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Ver anexo N°1 y 2, listado de plaguicidas.

Definiciones / Abreviaturas

- Plaguicidas: También llamados agroquímicos, son sustancias químicas destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de seres vivos considerados plagas.
- QuEChERS: Terminología en inglés (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) que significa rápido, fácil, económico, efectivo, robusto y seguro.
- LC/MS- MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem.
- UPLC : Cromatografía líquida de Ultra performance.
- GC- MS: Cromatógrafo de gases acoplada a espectrometría de masas.
- ESI: Fuente de Ionización electro spray.

- MeCN: Acetonitrilo.
- MgSO₄: Sulfato de magnesio anhidro.
- NaAc : Acetato de sodio.
- HOAc : ácido acético glacial
- GCB: Carbón grafitizado.

3.5.3. Técnica Operatoria

3.5.3.1. Principio

El método consiste en 4 procesos principales: proceso de preparación de la muestra, proceso de extracción que es realizada por partición líquido-líquido, proceso de limpieza realizado por extracción en fase dispersiva (Dispersive-SPE) y proceso de medición en los equipos cromatográficos acondicionados y calibrados.

El procedimiento consiste en tomar una porción de la muestra vegetal (frutos o verduras) molida y homogenizada, al cual se le adiciona acetonitrilo con ácido acético al 1% y una mezcla de sulfato de magnesio y acetato de sodio; el extracto obtenido es sometido a una limpieza o clean up en fase dispersiva (Dispersive-SPE) con sulfato de magnesio, amina primaria secundaria (PSA) y carbón grafitizado (CGB). Los residuos extraídos de plaguicidas (benzimidazoles, carbamatos, compuestos organoclorados, organofosforados, piretroides y triazinas) son determinados por cromatografía líquida con espectrometría de masa en tandem usando electrospray positivo (+) y por Cromatografía Gaseosa acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS).^{32,33,42}

3.5.3.2. Materiales y equipos.

Materiales:

- Tubos de polipropileno descartables de 15 y 50 ml con tapa rosca.
- Tabla de picar.
- Envases de vidrio para la conservación de la muestra.
- Cuchillos de acero inoxidable, espátulas.
- Pipeta automática con volumen variable de 10-100 uL

- Pipeta automática con volumen variable de 100-1000 uL
- Pipeta automática con volumen variable de 1000-5000 uL
- Puntas para pipetas automáticas de 1000-5000 uL, de 10-100 uL y de 100-1000 uL
- Pipetas Pasteur.
- Gradillas para tubos.
- Viales de 2,0 ml para autosampler HPLC y GC
- Frascos de vidrio o Viales con tapa rosca de 10 y 20 mL.
- Jeringas descartables de 1 y 5 mL.
- Filtros de jeringa PTFE 13 mm, 0.45 mm.

Equipos:

- Robot Coupe Blixer 3
- Balanza analítica Digital (marca A & D, modelo GR 200)
- Vortex Mixer (Marca: Barnstead Thermolyn, modelo: Maxi Mix II 8294c50).
- Centrífuga (Marca : Thermoelectron, modelo : Multi RF)
- Columna LC: C18 – 250 x 4,6 mm id, 5 µm.
- Cromatógrafo Líquido de Alta performance (HPLC): con bomba cuaternaria, auto sampler con control de temperatura, horno de columna y degasificador. (Marca : Waters, Modelo : Alliance 2695 XE.
- Cromatógrafo Líquido de Ultra performance (UPLC). Marca Waters , Modelo: Acquity.
- Espectrómetro de masas en tandem con sonda ESI en modo de operación positivo y negativo. Marca: Micromass, Modelo :Quatro Premier XE y *Xevo TQS*
- Software del LC-MSMS :Masslynx 4.1
- Cromatógrafo de gases acoplada a espectrómetro de masas Marca SHIMADZU Modelo: GCMS QP-2010.
- Columna capilar para GC: Rxt-5Ms 30m x 0,25um x 0,25 mm

3.5.3.3. Reactivos

Sustancias químicas

- Agua grado HPLC
- Acido fórmico 98% p.a
- Acetonitrilo - grado HPLC.
- Acetonitrilo - grado GC.
- Acetato de etilo grado GC.
- Ácido acético (HOAC) - Glacial
- 1% HOAc en MeCN – preparar la solución con 10 mL glacial HOAC en 1 L MeCN.
- Acido fórmico 6,7 mM en agua; añadir a una fiola de 250 mL unos 100mL de agua y luego agregar 64,3 uL de ácido fórmico, mezclar y luego completar a volumen con el mismo solvente.
- Cloruro de sodio grado reactivo.
- Sulfato de magnesio anhidro – pureza >98%: previo secado a 500° C mínimo por 5 horas para remover los ftalatos y agua residual.
- Amina primaria-secundaria (PSA)
- Carbón negro grafitizado (GCB)- para muestras con carotenoides y pigmentos.
- C-18 para muestras con contenido de grasas mayor al 1%
- Acetato de amonio. p.a

Fase móvil

HPLC:

- a) Fase móvil A: Solución Acido fórmico 5 mM en Agua, añadir 192 uL de ácido fórmico a una fiola de 1L conteniendo unos 150 mL de agua, mezclar y completar a volumen.
- b) Fase móvil B: Solución Acido fórmico 5 mM en Metanol, añadir 192 uL de ácido fórmico a una fiola de 1 L conteniendo unos 150 mL de metanol, mezclar y completar a volumen con el mismo solvente.

UPLC:

- a) Fase móvil A: Agua con acetato de amonio 10 mM y ácido acético 0.05%.
- b) Fase móvil B: Metanol con acetato de amonio 10 mM y ácido acético 0.05%.

Para preparar estas fases móviles se requiere lo siguiente:

Preparar 100 mL de una solución stock de Acetato de amonio 1M y ácido acético 5% (SOLUCION STOCK):

- Disolver 7.7 g de acetato de amonio en 95 mL de agua
- Añadir 5 mL de ácido acético glacial.
- Para preparar 500 mL de las fases móviles:
- Fase móvil A: añadir 5 mL de la solución stock a 495 mL de agua.
- Fase móvil B: añadir 5 mL de la solución stock a 495 mL de metanol

GC:

Gas Helio UHP 5.0

Estándares:

- Estándares químicos de plaguicidas de alta pureza.
- Mezclas de estándares en solución de concentraciones entre 100 a 2000 mg/L
- Estándar surrogado bromofos metilo a 2000 mg/L.
- Estándar interno Trifenilfosfato 200 mg/L

3.5.3.4. Preparación de los estándares de la curva matriz de los plaguicidas analizados por LC/MS-MS y GC-MS

- Solución stock primaria, aprox. 2000 ng/uL.

Pesar 20 mg de los estándar químicos de plaguicidas en una fiola de 10 mL (balón aforado), disolver en acetonitrilo con 0.1% de ácido acético. Disolver con ayuda del baño ultrasónico si es necesario y enrasar.

Almacenar a temperatura (-10° a -30°C) y en lugar oscuro. Estable un año

- Solución *Mix* de fortificación (QC Spike 1), 40 ng/uL, 80 ng/uL, y 160 ng/uL.

Transferir una alícuota de 1000 µL para 40 ng/uL, 2000 µL para 80 ng/uL o 4000 µL para 160 ng/uL de las Soluciones stock primario de plaguicidas a una fiola de 50 mL, diluir y enrasar:

Para el análisis por LCMS/MS con acetonitrilo en ácido acético 0,1%;

Para el análisis por GCMS con acetonitrilo grado GC.

Nota: para fiolas preparadas de menor volumen calcular el volumen adecuado.

Para el análisis por LCMSMS se han considerado cuatro grupos de mezclas:

Mix 1: plaguicidas organofosforados y carbamatos

Mix 2: plaguicidas tipo azoles y ureas

Mix 3: otros plaguicidas tipo triazinas, strobilurinas, etc.

Mix 4: comunes (iprodiona, etoprofos y triazofos)

- Solución *Mix* de fortificación (QC Spike 2), 5 ng/uL, 10 ng/uL o 20 ng/uL.

Transferir una alícuota de 1250 µL *de cada Mix de* Solución de fortificación (QC Spike 1) a una *misma* fiola de 10 mL, diluir y enrasar:

Para el análisis por LCMS/MS con acetonitrilo en ácido acético 0,1%;

Para el análisis por GCMS con acetonitrilo grado GC.

Preparación del estándar interno

- Solución stock de Trifenilfosfato, 200 ng/uL.

Pesar 20 mg de los estándar químicos de plaguicidas en una fiola de 100 mL (balón aforado), disolver en acetonitrilo con 1% HOAC. Disolver con ayuda del baño ultrasónico si es necesario y enrasar con acetonitrilo en ácido acético 1%.

- Solución de trabajo de trifenilfosfato, 2 ng/uL.

Transferir una alícuota de 1000 µL de la solución stock 200 ng/uL a una fiola de 100ml, diluir y enrasar con ácido acético al 1 % en acetonitrilo.

Preparación de estándar surrogado (añadido antes de la extracción)

- Solución stock de bromofos metilo y *prometrina*, 2000 ng/uL.

Pesar 20 mg de los estándar bromofos metilo y *prometrina en forma independiente* una fiola de 10 mL (balón aforado), disolver en acetonitrilo con 0.1% HOAC. Disolver con ayuda del baño ultrasónico si es necesario y enrasar con acetonitrilo en ácido acético 0.1%.

- Solución de trabajo de bromofos metilo y *prometrina* 40 ng/uL.

Transferir una alícuota de 500 µL de *ambas* solución stock 2000 ng/uL a una *misma fiola* de 25ml, diluir y enrasar con acetonitrilo.

Preparación de los estándares para la curva de calibración por GC-MS.

Se preparan de acuerdo a la siguiente tabla:

Curva de calibración de plaguicidas

| Nivel | Solución QC spike 40, 80 y 160 ng/uL. Volumen en (μL) | Solución HAc 0,1%, mL | Volumen final, mL | Concentración ng/uL |
|-------|--|--------------------------------|-------------------------|------------------------|
| 5 | 500 | 1 | 10 | 2 / 4 / 8 |
| 4 | 250 | 1 | 10 | 1 / 2 / 4 |
| 3 | 125 | 1 | 10 | 0,5 / 1 / 2 |
| 2 | 50 | 1 | 10 | 0,2 / 0,4 / 0,8 |
| 1 | 25 | 1 | 10 | 0,1 / 0,2 / 0,4 |

Preparación de los estándares para la curva de calibración por HPLC-LCMS-MS

Se preparan de acuerdo a la siguiente tabla:

Curva de calibración de plaguicidas

| Nivel | Solución QC spike1* (40 y 80 ng/uL) Volumen en (μL) | Solución HAc 0,1%, ml | Volumen final, ml | Concentración ng/uL |
|-------|--|--------------------------------|-------------------------|------------------------|
| | | | | |

| | | | | |
|---|------|---|----|-----------|
| 5 | 1250 | 1 | 10 | 5/ 10 |
| 4 | 500 | 1 | 10 | 2/ 4 |
| 3 | 250 | 1 | 10 | 1 / 2 |
| 2 | 50 | 1 | 10 | 0,2/ 0.4 |
| 1 | 25 | 1 | 10 | 0,1 / 0.2 |

*Mix 1, 2,3 y 4.

3.5.3.5. Análisis de la Muestra.

Preparación de la muestra previa al análisis

Las muestras de manzanas y uvas se trozan en pequeñas porciones*, luego se conservan a temperatura entre -10°C y -25°C , hasta el momento de su molienda y pesada para el análisis.

* Se siguen los lineamientos del Codex “CAC/GL 41-1993 PARTE DEL PRODUCTO A LA QUE SE APLICAN LOS LIMITES MAXIMOS DEL CODEX PARA RESIDUOS Y QUE SE ANALIZA”. Para la parte de las muestras que se considera en el análisis.

Procedimiento de extracción de residuos de plaguicidas en la muestra

Analizar un control o controles negativos para curva matriz y controles positivos o fortificados con cada set de muestras y *duplicados cada 5 muestras*.

- a) Se pesa $15 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ de muestra en tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL. (por duplicado para la muestra a investigar), una muestra control negativo o blanco de matriz, 01 o 02 blancos fortificados a los niveles más bajos como se indica en la tabla del punto b.

Nota1. Para muestras con contenido menor de 30% de agua, se *pesa 2.5 o 5.0* g de muestra y se adiciona 10 mL de agua, homogenizar manualmente o por vortex.

- b) Para las muestras fortificadas o de control positivo se toma en consideración los LMR establecidos por CODEX o por la Comunidad Europea, para el cual

se usa una alícuota de la mezcla de estándares del nivel 5 para GC-MS y HPLC-MS-MS, se homogeniza usando vortex y dejar en reposo por 15 minutos.

Normalmente se preparan fortificaciones en muestras blancos entre 5 a 200 ug/kg de cada plaguicida.

Nota 2: Se elige la concentración según el LMR.

- c) A todas las muestras se adiciona un estándar surrogado Bromofos metilo a una concentración de 100 ug/kg (GCMS) y un estándar de prometrina a una concentración de 100 a 200 ug/kg (GC-MS y LCMSMS).
- d) Se adiciona 15 mL de solución de Acetonitrilo con 1% de ácido acético, homogenizar con ayuda de vortex o manualmente por 1 minuto y luego adicionar la mezcla de sales (1,5 g acetato de sodio anhidro + 6 g sulfato de magnesio anhidro). Agitar con ayuda de vortex o manualmente por 1 minuto para romper los grumos asegurando que se vuelva una mezcla homogénea, ocurre una reacción exotérmica por lo que se recomienda refrigerar por espacio de 60 segundos.
- e) Se agita vigorosamente por 1 minuto adicional y luego se centrifuga mínimo 3000 rpm por 3 minutos.

Limpieza o Clean up de los extractos

- a) Para la curva de estándar: Se transfiere 10 mL de extracto, Para las muestras en investigación, muestras blanco, blanco de reactivos: Se transfiere 3 mL para el análisis por LC-MS-MS y por GC-MS a un vial conteniendo 150 mg de MgSO₄ y 50 mg de PSA por cada mL de extracto.
- b) Adicionar 7,5 mg de GCB por mL de extracto para muestras que contengan carotenoides y clorofila.
Adicionar 50 mg de sorbente C18 por mL de extracto para muestras que contienen > de 1% de grasa.

O adicionar ambos para aquellos que tengan alto contenido de pigmentos y grasas. Ver anexo 3 matrices analizadas en rutina.

- c) Se mezcla vigorosamente con ayuda de vortex o manualmente por espacio de 30 a 60 segundos, luego se centrifuga entre 2000 y 3000 rpm por 3 minutos de tal modo que se evite ruptura de los frascos de vidrio.

Preparación de los extractos para análisis por HPLC-MS-MS

- a) Se transfiere 500 uL del extracto limpio a otro vial o tubo eppendorf y se adiciona 50uL de Solución de trabajo de estándar interno de trifenilfosfato (2 ng/uL).
- b) Se mezcla y se adiciona 25 uL de acetonitrilo para el caso de blanco, muestras y controles positivos.
- c) Para los viales que servirán para la curva de calibración adicionar 25 uL de cada uno de los 5 estándares preparados en el punto 5.5.8, para obtener concentraciones de 5 hasta 250 ng/g. de cada plaguicida en la matriz.
- d) Se mezcla y se adiciona 500 uL de ácido fórmico 6,7 mM a todos los viales.
- e) Se filtrar a través de un filtro de jeringa PTFE 0,45 um dentro de viales del autosampler de HPLC y hacer las lecturas respectivas en el LC/MS-MS.

| Curva de calibración de plaguicidas | |
|-------------------------------------|--|
| Nivel | Concentración Equivalente HPLC–MS-MS(ng/g) |
| 5 | 250/500 |
| 4 | 100/200 |
| 3 | 50/100 |
| 2 | 10/20 |
| 1 | 5/10 |

Preparación de los extractos para análisis por GC-MS

- Se transfiere 1000 uL del extracto limpio a un vial del autosampler.
- A todos los viales se adiciona 100 uL de Solución de trabajo de estándar interno de trifenilfosfato (2 ng/uL) y 50 uL de acetonitrilo para los blancos y muestras y mezclar.
- Para los viales que servirán para la curva de calibración adicionar 50 uL de cada uno de los 5 niveles de estándares preparados en el punto 5.5.6, para obtener concentraciones en el rango de 5 a 20 ng/g hasta 100 a 400 ng/g. de cada plaguicida en la matriz.
- Las concentraciones de los niveles de calibración son:

| Curva de calibración de plaguicidas | |
|-------------------------------------|---|
| Nivel | Concentración (ug/L o ng/g equivalente) |
| 5 | 100 / 200 / 400 |
| 4 | 50 / 100 / 200 |
| 3 | 25 / 50 / 100 |
| 2 | 10 / 20 / 40 |
| 1 | 5 / 10 / 20 |

Finalmente transferir mínimo 500 uL de solución a viales para su lectura por el equipo cromatógrafo de gases con espectrómetro de masas.

3.5.3.6. Optimización del método

Aptitud del sistema

Verificar la aptitud del sistema al inicio de la secuencia de corridas o después de un cambio considerable (cambio de columna o una reparación) empleando un estándar de concentración intermedia de la curva de calibración inyectado por triplicado. Evaluar el %RSD de las respuestas de un analito (como mínimo) correspondientes a un mismo vial, el cual no debe ser mayor del 10% y el %RSD de los tiempos de retención no exceda de 2.5%

Condiciones Instrumentales:

Para el Sistema Cromatográfico HPLC

| | |
|------------------------|---|
| Columna cromatográfica | Fase reversa C18, 150 mm x 2,1 mm, 3,5 um |
| Fase Móvil | Fase Móvil A: Fase Móvil B 30 : 70 |
| Condición de flujo : | Gradiente(*) |
| Flujo: | 0.2 mL/min |
| Volumen de inyección | 10 uL |
| Temperatura | 40°C |

Fase móvil A: Acido Fórmico 5 mM en agua

Fase móvil B: Acido Fórmico 5 mM en metanol

Equilibrar el sistema LC por lo menos 30 min con Fase móvil A: Fase móvil B (30 %:70%).

Condiciones del gradiente de elución*

| Tiempo (min) | A | B | Flujo (mL/min) | Curva |
|--------------|------|-------|----------------|-------|
| 0 | 30.0 | 70.0 | 0.20 | 1 |
| 2.5 | 30.0 | 70.0 | 0.20 | 1 |
| 12.00 | 0.0 | 100.0 | 0.30 | 6 |
| 15.00 | 0.0 | 100.0 | 0.30 | 6 |
| 20.00 | 30.0 | 70.0 | 0.20 | 1 |

Para el Sistema Cromatográfico UPLC

| | |
|------------------------|---|
| Columna cromatográfica | Fase reversa C18, 100 mm x 2,1 mm, 1,7 um |
| Fase Móvil | Fase Móvil A: Fase Móvil B 80 : 20 |
| Condición de flujo : | Gradiente(*) |
| Flujo: | 0.4 mL/min |
| Volumen de inyección | 2 uL |
| Temperatura | 40°C |

Fase móvil A: Agua con acetato de amonio 10 mM y ácido acético 0.05%

Fase móvil B: Metanol con acetato de amonio 10 mM y ácido acético 0.05%

Equilibrar el sistema LC por lo menos 5 min con Fase móvil A: Fase móvil B (80 %:20%).

Condiciones del gradiente de elución*

| Tiempo (min) | A | B | Flujo (mL/min) | Curva |
|--------------|------|------|----------------|-------|
| 0 | 80.0 | 20.0 | 0.40 | 6 |
| 0.5 | 80.0 | 20.0 | 0.40 | 6 |
| 4.0 | 10.0 | 90.0 | 0.40 | 6 |
| 6.0 | 10.0 | 90.0 | 0.40 | 6 |
| 6.1 | 80.0 | 20.0 | 0.40 | 6 |
| 8.0 | 80.0 | 20.0 | 0.40 | 6 |

Sistema espectrométrico (MS/MS)

| | |
|--|------------------------|
| Fuente de Ionización | Electrospray (ESI) |
| Modo de Ionización | Positivo $[M+H]^+$ |
| Temperatura de la fuente (°C) | 120 (HPLC) -150 (UPLC) |
| Temperatura de solvatación (°C) | 350 |
| Flujo de gas de cono ((L/Hr): | 50 |
| Flujo del gas de solvatación (L/Hr) | 800 |
| Resolución LM1 | 12.5 - 13 |
| Resolución HM1 | 12.5 - 13 |
| Multiplicador (V) | 650 |
| Flujo de bomba de jeringa (mL/min) | 10 |
| Presión de Gas en la Celda Pirani (mbar) | 3.93e-3 |

Sistema Cromatográfico GC-MS:

| | |
|---------------------------|--|
| Columna Capilar | Rtx® - 5MS 0,25mm ID x 0,25 um película x 30 m longitud <i>o equivalente</i> |
| Temperatura del Inyector: | Gradiente desde 80 a 250 °C |
| volumen de inyección | 2 µL |
| Detector: | Espectrómetro de masas |
| Temperatura del Horno: | Gradiente desde 75 a 300 °C * |
| Gas carrier: | Helio UHP 5.0 |
| Modo de inyección: | PTV-Spliless |
| Modelo del instrumento | GCMS-QP2010 |

Gradiente de Temperatura*

| Caudal (mL/min) | Temperatura final (°C) | Tiempo de permanencia a la temperatura final (min) |
|-----------------|------------------------|--|
| - | 75 | 2 |
| 10 | 230 | 1 |
| 10 | 280 | 10 |

*-condiciones pueden variar de acuerdo a columna.

Optimización del MS-MS

Plaguicidas analizados por GC-MS, modo de ionización EI (ionización electrónica) y modo de adquisición SIM (monitoreo de iones simple) (*ver Anexo N°2*)

Plaguicidas analizados por LC-MS/MS, modo de ionización ESI positivo y modo de adquisición MRM (Monitoreo Reacción Múltiple) : (*ver Anexo N°4*)

3.5.3.7. Cálculo y Expresión de Resultados

El procesamiento de datos de las muestras, blancos, y estándares se realiza con el software MassLynx 4.1 con la aplicación QuanLynx 4.1 para el LC MS-MS y Con el software GC-MS Solution en el cromatógrafo de Gases GCMS-QP2010-SHIMADZU.

Las concentraciones obtenidas de las muestras, fortificados y blancos son resultado del ploteo de los ratios en la curva de regresión.

Los pesos de muestras concentraciones de estándares y resultados se registran en los formatos REG-UCCIRT/Res-10 y REG-UCCIRT/Lab-61 de acuerdo al procedimiento de ensayo PRO-UCCIRT/Lab-02.

Los plaguicidas que son mezclas de isómeros se reportarán como promedio de los valores obtenidos en cada isómero.

Cuando exista interferencia de matriz y se decida cuantificar sólo con algunos de los isómeros se podrá reportar el resultado si el especialista lo justifica y coloca las observaciones respectivas en las hojas de trabajo.

La confirmación de los resultados se realizará a las muestras que presenten resultados mayores al límite máximo de residuos (LMR) y teniendo en cuenta las directrices del Codex se procede a evaluar la segunda transición MRM de confirmación para el análisis por LC/MS-MS.

Recuperación: En las muestras fortificadas el porcentaje de recuperación se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Conc.}_d}{\text{Conc.}_f} \times 100$$

Conc._f

Donde:

Conc._d = Concentración experimental del plaguicida en la muestra fortificada, ng/g

Conc._f = Concentración conocida adicionada del plaguicida, ng/g

Se reportara todos los plaguicidas cuya recuperación de muestras fortificadas se encuentren entre 50 a 130 % de recuperación.

A criterio del analista se reportara solamente como screening los plaguicidas cuya recuperación se encuentra fuera de los límites aceptables siempre y cuando se evidencie linealidad en la curva matriz, y no se obtenga presencia en la muestra.

No se reportará los plaguicidas que presenten interferencia en la curva matriz y no se evidencie linealidad y además no se obtenga recuperación en la muestra fortificada.

Para plaguicidas que son determinados por ambas técnicas se reportara el resultado de la concentración del plaguicida obtenido en la muestra por la técnica en la cual se obtenga una recuperación aceptable entre 70- 120 % de la muestra fortificada.

Antecedentes

- AOAC Official Method 2007.01 Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and partitioning with Magnesium Sulfate liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry.
- “Lehotay S. (2007), *J.AOAC int.90*, 490-520”, Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study.

CAPITULO IV: RESULTADOS

CUADRO N°1

Resultado General de la Determinación de Plaguicidas Organofosforados en Manzanas y Uvas del distrito de Calango y Las Flores.

| N° | MUESTRA | PLAGUICIDA FOSFORADO | OTROS PLAGUICIDAS | mg/Kg | LC-MS/MS | GC/MS |
|----|--------------|----------------------|-------------------|-------|----------|-------|
| 1 | Manzana C.1 | Negativo | Tebuconazol | 0.010 | Si | ----- |
| 2 | Manzana C.2 | Negativo | Cipermetrina | 0.078 | ----- | Si |
| 3 | Manzana C.3 | Negativo | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 4 | Manzana C.4 | Negativo | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 5 | Manzana C.5 | Negativo | Tebuconazol | 0.011 | Si | ----- |
| 6 | Manzana LF.1 | Negativo | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 7 | Manzana LF.2 | Negativo | Cipermetrina | 0.110 | ----- | Si |
| 8 | Manzana LF.3 | Negativo | Tebuconazol | 0.020 | Si | ----- |
| 9 | Manzana LF.4 | Negativo | Cipermetrina | 0.015 | ----- | Si |
| 10 | Manzana LF.5 | Negativo | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 11 | Uva C.1 | Negativo | Buprofezin | 0.007 | Si | ----- |
| | | | Ciprodenil | 0.561 | Si | ----- |
| | | | Piraclostrobin | 0.255 | Si | ----- |
| 12 | Uva C.2 | Negativo | Ciprodinil | 0.283 | Si | ----- |
| | | | Paraclostrobin | 0.094 | Si | ----- |
| 13 | Uva C.3 | Negativo | Buprofezin | 0.036 | Si | ----- |
| | | | Ciprodinil | 0.441 | Si | ----- |
| | | | Piraclostrobin | 0.131 | Si | ----- |
| 14 | Uva C.4 | Negativo | Ciprodinil | 0.508 | Si | ----- |
| | | | Piraclostrobin | 0.204 | Si | ----- |
| 15 | Uva C.5 | Negativo | Ciprodinil | 0.333 | Si | ----- |
| | | | Piraclostrobin | 0.162 | Si | ----- |
| 16 | Uva LF.1 | Negativo | Ciprodinil | 0.440 | Si | ----- |
| | | | Piraclostrobin | 0.210 | Si | ----- |
| 17 | Uva LF.2 | Negativo | Buprofezin | 0.080 | Si | ----- |
| | | | Ciprodenil | 0.460 | Si | ----- |
| | | | Piraclostrobin | 0.190 | Si | ----- |
| 18 | Uva LF.3 | Negativo | Ciprodenil | 0.300 | Si | ----- |
| | | | Piraclostrobin | 0.200 | Si | ----- |
| 19 | Uva LF.4 | Negativo | Ciprodenil | 0.340 | Si | ----- |
| | | | Piraclostrobin | 0.180 | Si | ----- |
| 20 | Uva LF.5 | Negativo | Ciprodenil | 0.210 | Si | ----- |
| | | | Piraclostrobin | 0.110 | Si | ----- |

CUADRO N° 2

Presencia de plaguicidas en muestras de manzanas y uvas de los distritos de Calango y Santa Cruz de Flores.

N° DE CASOS: 20 AÑO: 2015

| PRESENCIA | N° DE MUESTRAS | PORCENTAJE |
|-----------|----------------|------------|
| Positivo | 15 | 75 |
| Negativo | 05 | 25 |
| TOTAL | 20 | 100 |

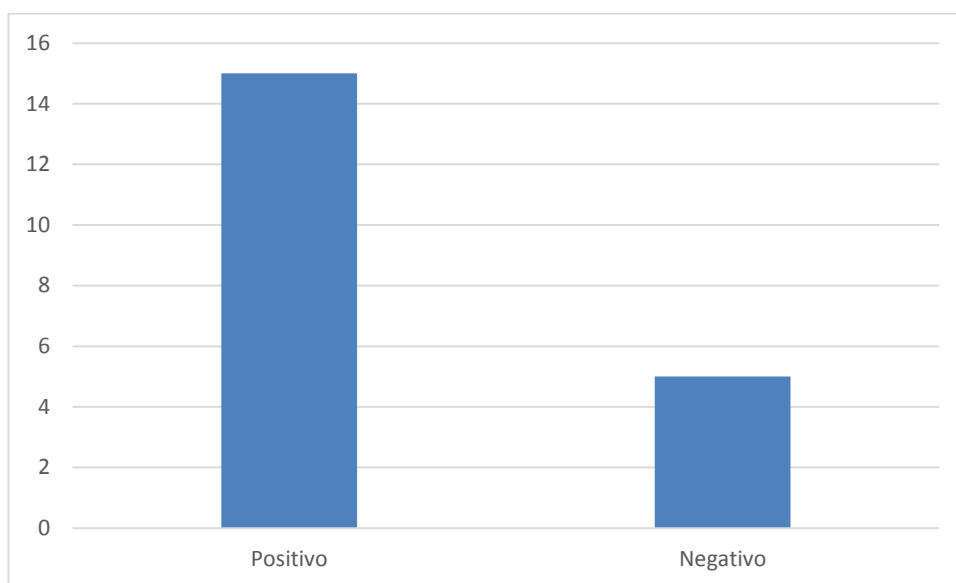


Figura 1: Presencia de plaguicidas en muestras de manzanas y uvas de los distritos de Calango y Santa Cruz de Flores

CUADRO N° 3

Presencia de plaguicidas fosforados en muestras de manzanas y uvas de los distritos de Calango y Santa Cruz de Flores.

| PRESENCIA | N° DE MUESTRAS | PORCENTAJE |
|--------------------|----------------|------------|
| Órganos Fosforados | 00 | 00 |
| Otros plaguicidas | 15 | 75 |
| Negativo | 05 | 25 |
| TOTAL | 20 | 100 |

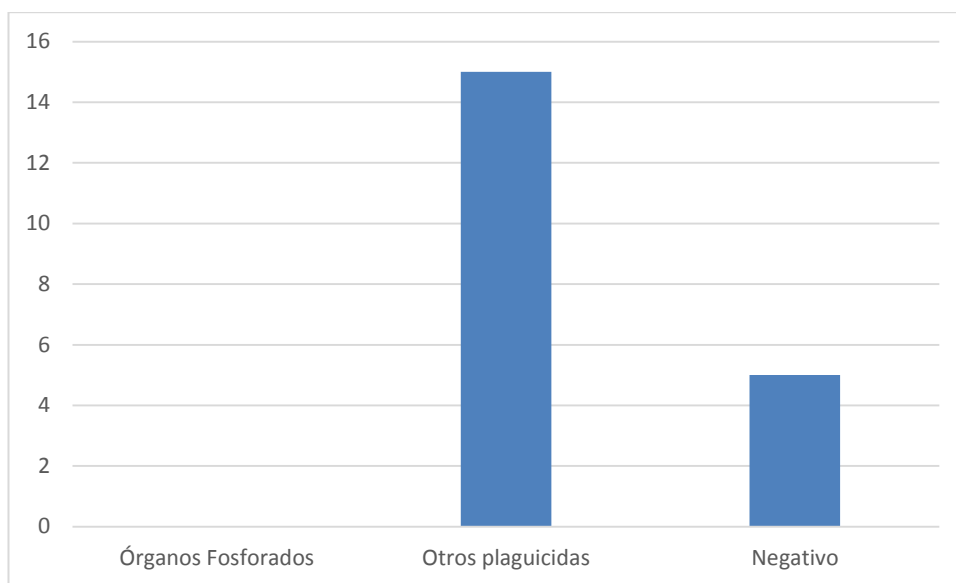


Figura 2: Presencia de plaguicidas fosforados en muestras de manzanas y uvas de los distritos de Calango y Santa Cruz de Flores.

CUADRO N° 4

Presencia de plaguicidas en muestras de manzana y uvas de los distritos de Calango y Santa Cruz de Flores.

| DISTRITO | POSITIVO | NEGATIVO | PORCENTAJE |
|----------------------|----------|----------|------------|
| Calango | 05 | 05 | 50 |
| Santa Cruz de Flores | 10 | 00 | 50 |
| TOTAL | 15 | 05 | 100 |

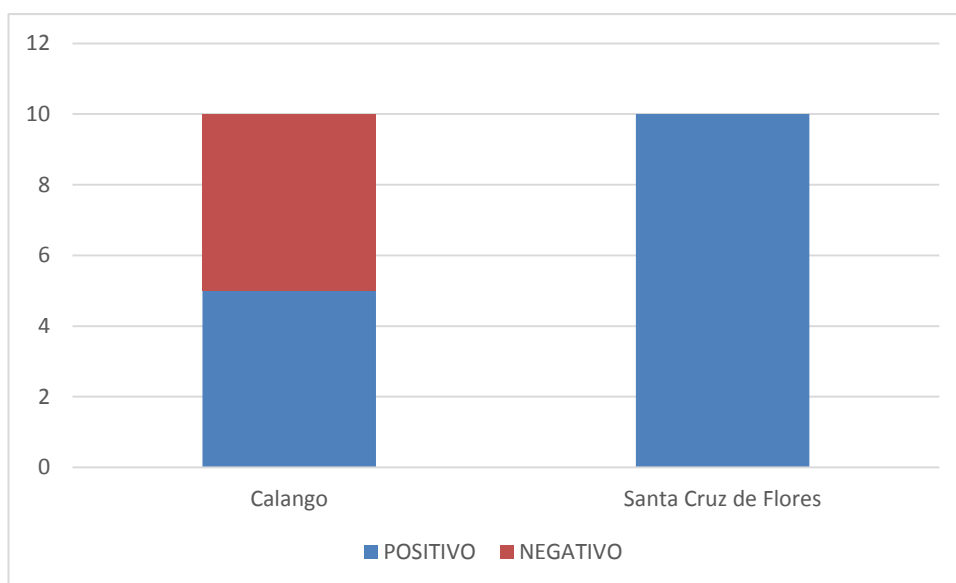


Figura 3: Presencia de plaguicidas en muestras de manzana y uvas de los distritos de Calango y Santa Cruz de Flores.

CUADRO N° 5

Plaguicidas órganos fosforados en muestras de manzanas del distrito de Calango.

| PRESENCIA PLAGUICIDAS | N° DE CASOS | PORCENTAJE |
|--------------------------|-------------|------------|
| Órgano fosforados | 00 | 00 |
| Otros plaguicidas | 02 | 40 |
| Negativos | 03 | 60 |
| TOTAL | 05 | 100 |

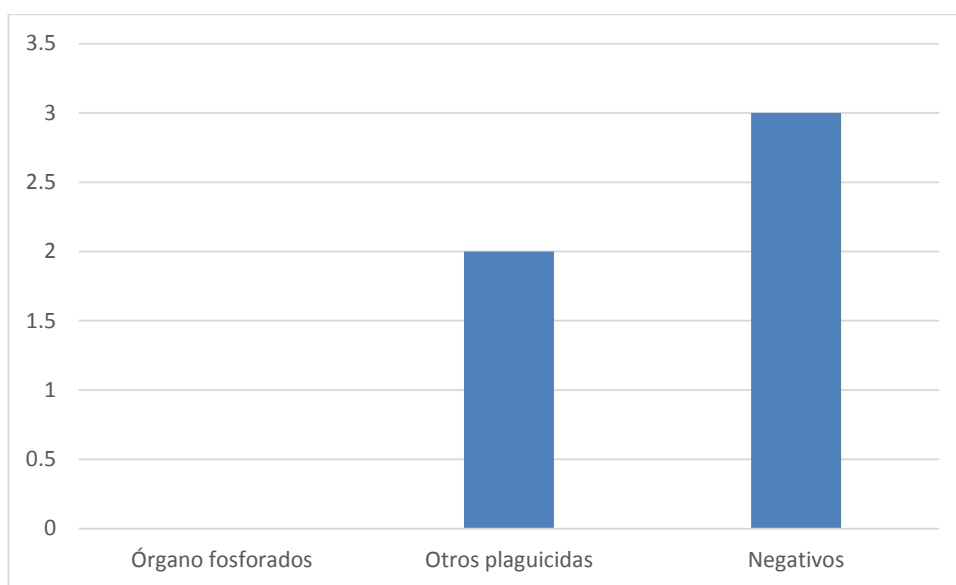


Figura 4: Plaguicidas órganos fosforados en muestras de manzanas del distrito de Calango.

CUADRO N° 6

Presencia de plaguicidas órgano fosforados en muestras de manzanas del distrito de Santa Cruz de Flores.

| PRESENCIA PLAGUICIDAS | N° DE CASOS | PORCENTAJE |
|--------------------------|-------------|------------|
| Órgano fosforados | 00 | 00 |
| Otros plaguicidas | 03 | 60 |
| Negativos | 02 | 40 |
| TOTAL | 05 | 100 |

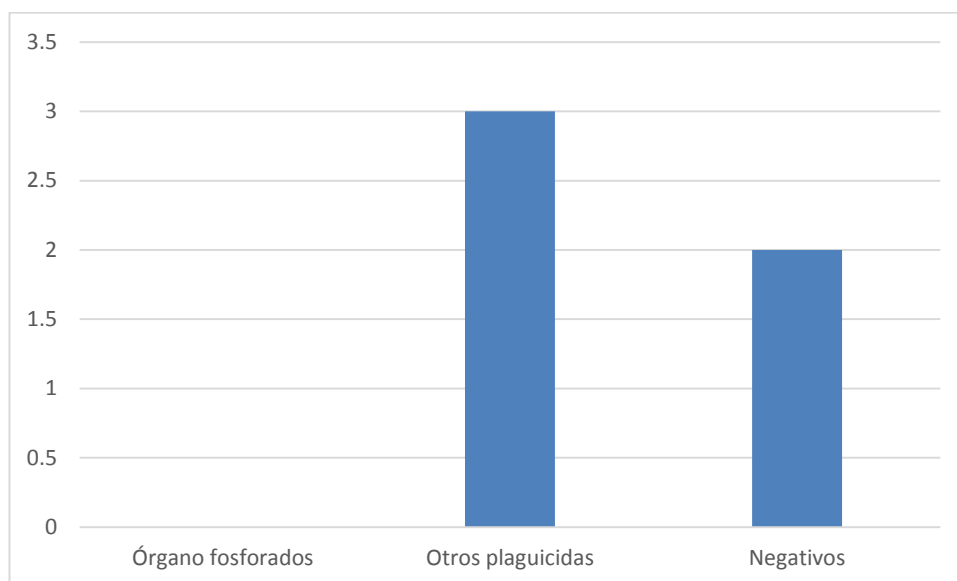


Figura 5: Presencia de plaguicidas órgano fosforados en muestras de manzanas del distrito de Santa Cruz de Flores.

CUADRO N° 7

Presencia de plaguicidas órganos fosforados en muestras de uvas del distrito de Calango.

| PLAGUICIDAS | N° DE CASOS | PORCENTAJE |
|-------------------|-------------|------------|
| Órgano fosforados | 00 | 00 |
| Otros plaguicidas | 05 | 100 |
| Negativos | 00 | 00 |
| TOTAL | 05 | 100 |

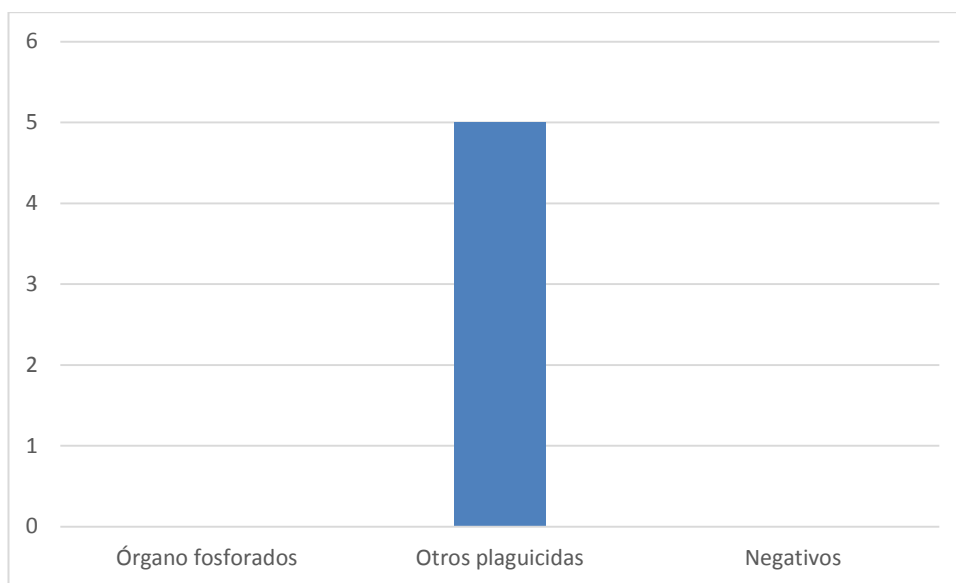


Figura 6: Presencia de plaguicidas órganos fosforados en muestras de uvas del distrito de Calango.

CUADRO N° 8

Presencia de plaguicidas órganos fosforados en muestras de uvas del distrito de Santa Cruz de las Flores.

| PLAGUICIDAS | N° DE CASOS | PORCENTAJE |
|-------------------|-------------|------------|
| Órgano fosforados | 00 | 00 |
| Otros plaguicidas | 05 | 100 |
| Negativos | 00 | 00 |
| TOTAL | 05 | 100 |

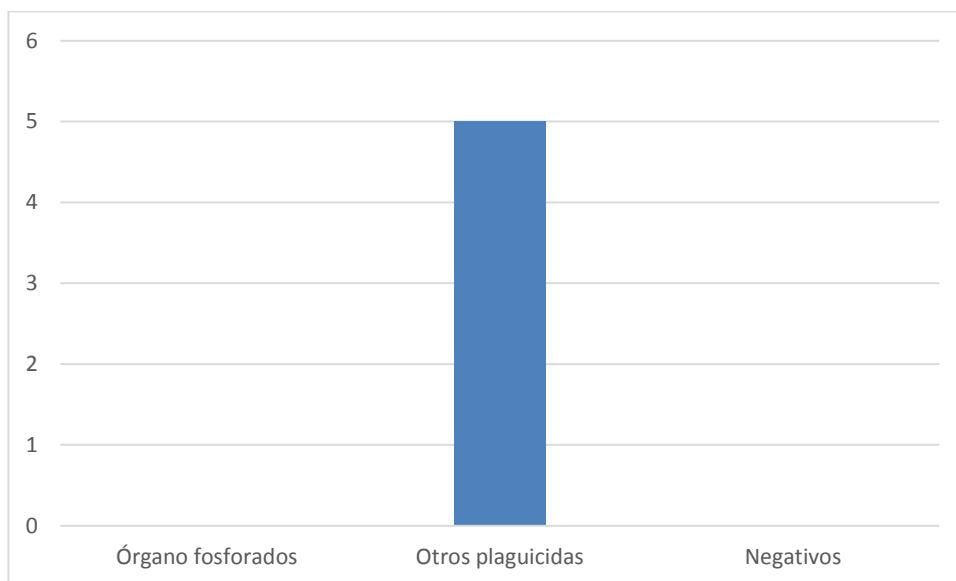


Figura 7: Presencia de plaguicidas órganos fosforados en muestras de uvas del distrito de Santa Cruz de las Flores.

CUADRO N° 9

Presencia de plaguicidas no órganos fosforados en muestras de uva y manzana de los distritos de Calango y de Santa Cruz de las Flores.

| PLAGUICIDAS FOSFORADO | NO | N° DE CASOS | PORCENTAJE |
|--------------------------|----|-------------|------------|
| Tebuconazol | | 03 | 10.34 |
| Cipermetrina | | 03 | 10.34 |
| Buprofezin | | 03 | 10.34 |
| Ciprodenil | | 10 | 34.49 |
| Piraclostrobin | | 10 | 34.49 |
| TOTAL | | 29 | 100 |

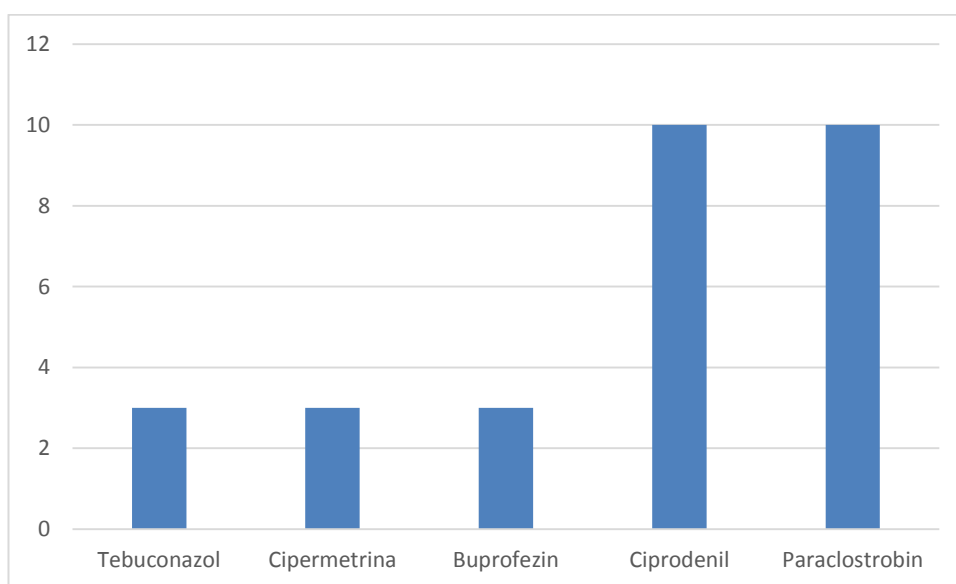


Figura 8: Presencia de plaguicidas no órganos fosforados en muestras de uva y manzana de los distritos de Calango y de Santa Cruz de las Flores.

CUADRO N° 10

Presencia de plaguicidas no órganos fosforados en muestras de manzana de los distritos de Calango y de Santa Cruz de las Flores.

| PLAGUICIDAS FOSFORADO | NO | N° DE CASOS | PORCENTAJE |
|--------------------------|----|-------------|------------|
| Tebuconazol | | 03 | 50 |
| Cipermetrina | | 03 | 50 |
| TOTAL | | 06 | 100 |

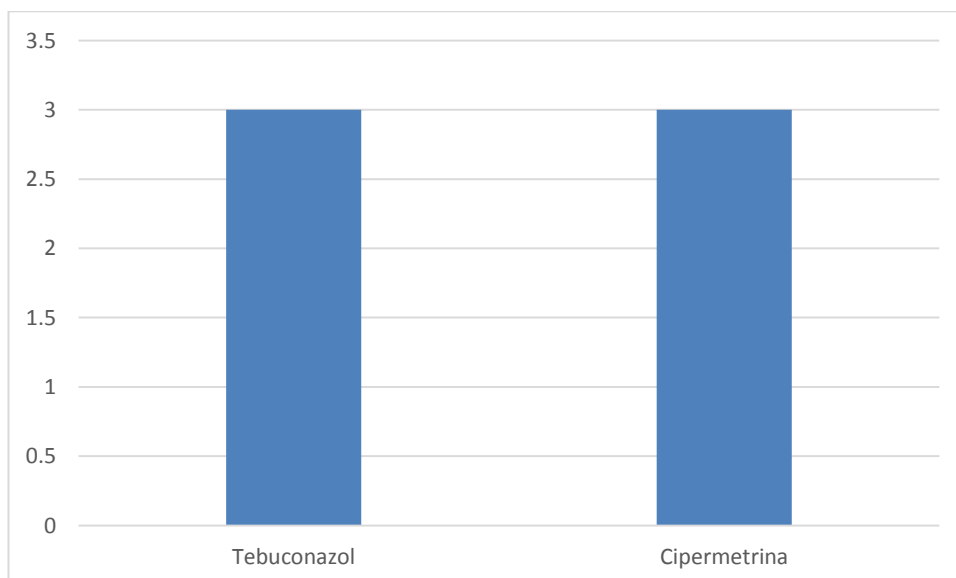


Figura 9: Presencia de plaguicidas no órganos fosforados en muestras de manzana de los distritos de Calango y de Santa Cruz de las Flores.

CUADRO N° 11

Presencia de plaguicidas no órganos fosforados en muestras de uvas de los distritos de Calango y de Santa Cruz de las Flores.

| PLAGUICIDAS FOSFORADO | NO | N° DE CASOS | PORCENTAJE |
|--------------------------|----|-------------|------------|
| Buprofezin | | 03 | 13.04 |
| Ciprodenil | | 10 | 43.48 |
| Piraclostrobin | | 10 | 43.48 |
| TOTAL | | 23 | 100 |

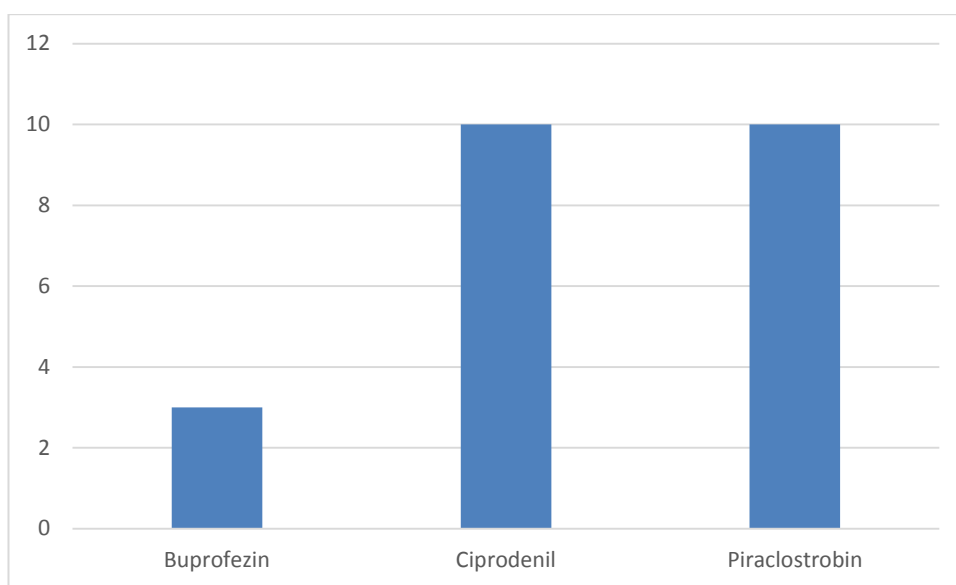


Figura 10: Presencia de plaguicidas no órganos fosforados en muestras de uvas de los distritos de Calango y de Santa Cruz de las Flores.

CUADRO N° 12

Grupos etáreos encuestados del distrito de Calango y Santa Cruz de Flores.

| GRUPO ETÁREO | N° DE CASOS | PORCENTAJE |
|--------------|-------------|------------|
| 41 - 45 | 03 | 15 |
| 46 - 50 | 03 | 15 |
| 51 - 55 | 06 | 30 |
| 56 - 60 | 06 | 30 |
| 61 - 65 | 02 | 10 |
| TOTAL | 20 | 100 |

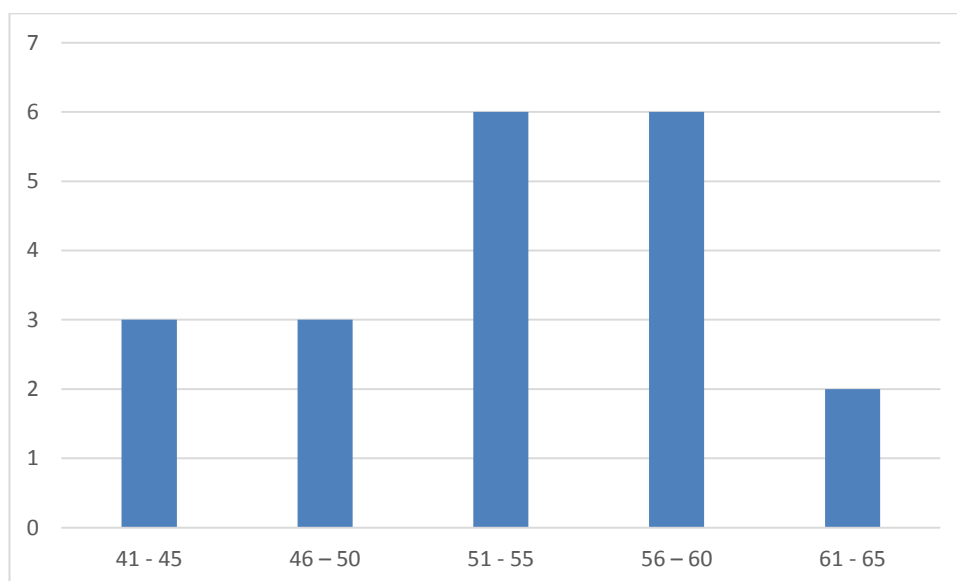


Figura 11: Grupos etáreos encuestados del distrito de Calango y Santa Cruz de Flores.

CUADRO N° 13

Elección de plaguicidas a usar en cultivo de manzana y uvas de los agricultores de Calango y Santa Cruz de Flores.

| TIPO | N° DE CASOS | PORCENTAJE |
|---------------------------------|-------------|------------|
| Por asesoría técnica. | 02 | 10 |
| Por recomendación de un amigo. | 01 | 05 |
| Por su propio criterio. | 15 | 75 |
| Por recomendación del vendedor. | 02 | 10 |
| TOTAL | 20 | 100 |

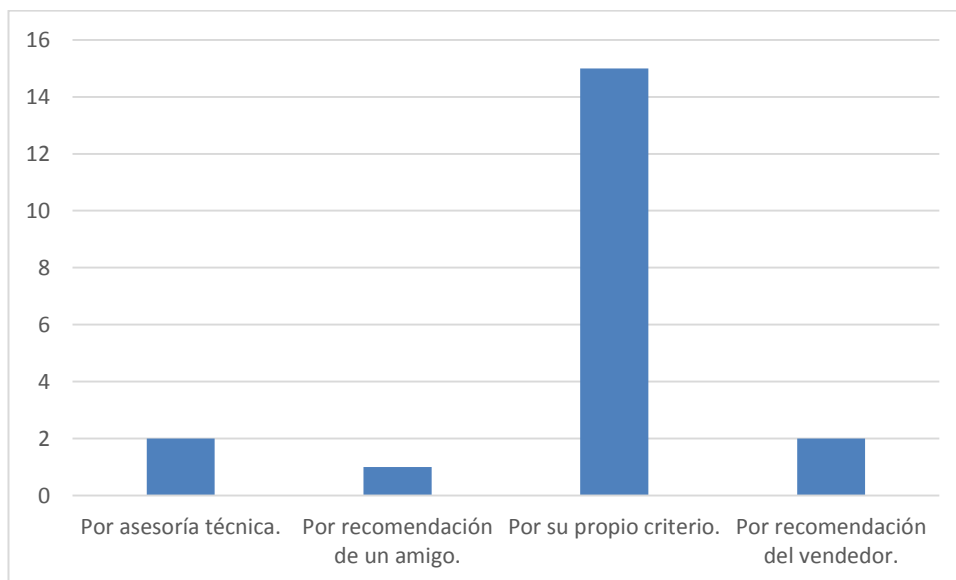


Figura 12: Elección de plaguicidas a usar en cultivo de manzana y papa de los agricultores de Calango y Santa Cruz de Flores.

CUADRO N° 14

En qué momento de cultivo hacen uso de plaguicidas los agricultores de manzana y uvas del distrito de Calango y Santa Cruz de Flores.

| USO | N° DE CASOS | PORCENTAJE |
|---------------------|-------------|------------|
| Desde el inicio. | 20 | 100 |
| Al inicio. | 00 | 00 |
| Al final. | 00 | 00 |
| A medio del cultivo | 00 | 00 |
| TOTAL | 20 | 100 |

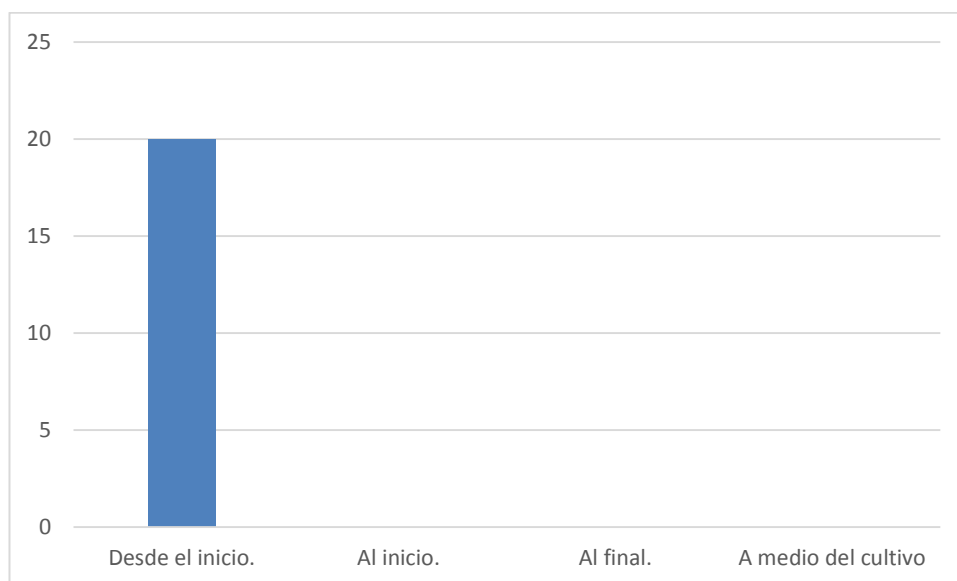


Figura 13: En qué momento de cultivo hacen uso de plaguicidas los agricultores de manzana y uvas del distrito de Calango y Santa Cruz de Flores.

CUADRO N° 15

Recepción de información técnica adecuada de los agricultores de Calango y Santa Cruz de Flores para el buen manejo de los plaguicidas.

| RECIBE ASESORIA | N° DE CASOS | PORCENTAJE |
|-----------------|-------------|------------|
| SI | 03 | 15 |
| NO | 06 | 30 |
| IREGULARMENTE | 11 | 55 |
| TOTAL | 20 | 100 |

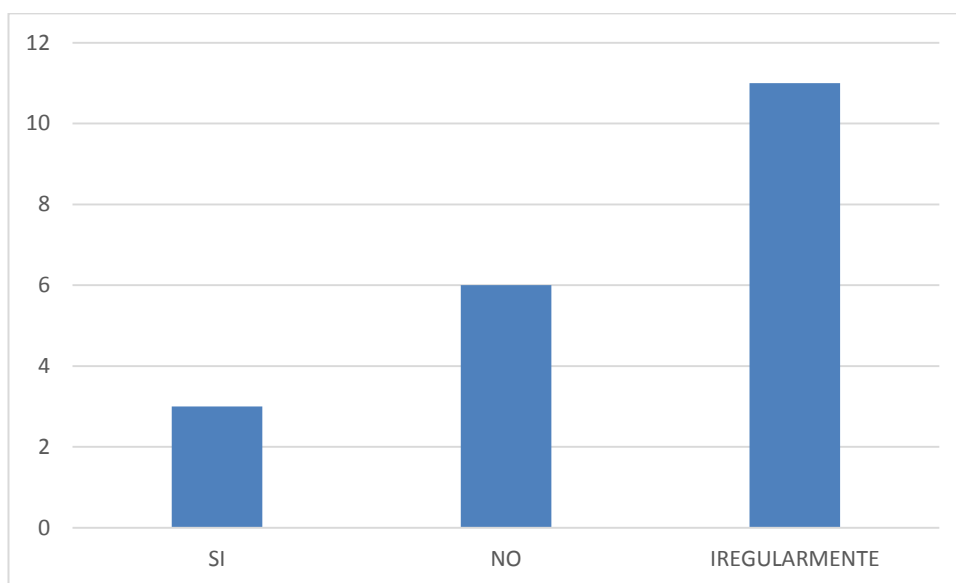


Figura 14: Recepción de información técnica adecuada de los agricultores de Calango y Santa Cruz de Flores para el buen manejo de los plaguicidas.

CUADRO N° 16

Que equipo de protección usan los agricultores de manzanas y uvas del distrito de Calango y Santa Cruz de Flores.

| EQUIPO | N° DE CASOS | PORCENTAJE |
|--------------------|-------------|------------|
| Guantes | 20 | 100 |
| Mascarillas | 10 | 50 |
| Lentes | 05 | 25 |
| Sombrero | 20 | 100 |
| Ropa de protección | 02 | 10 |
| Pañuelos | 10 | 50 |

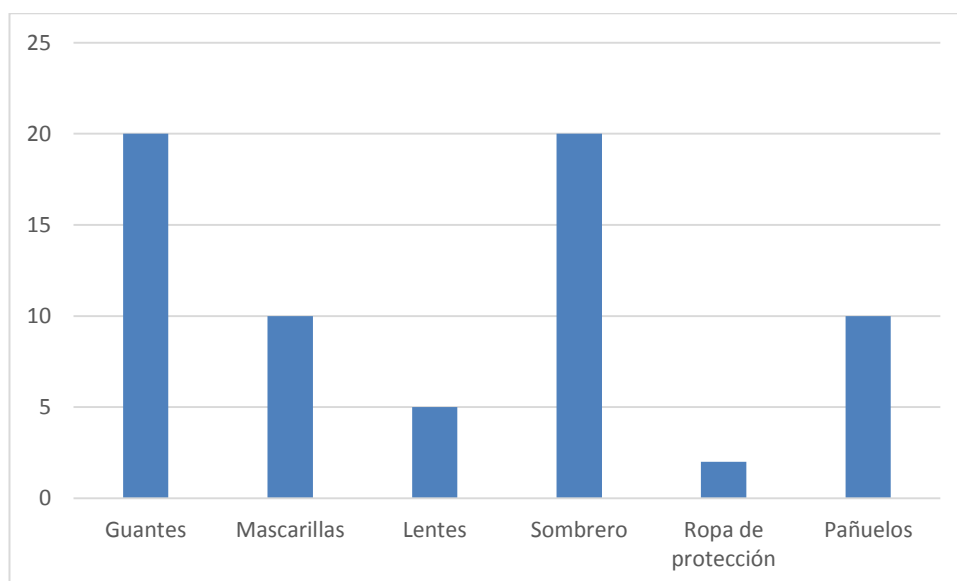


Figura 15: Que equipo de protección usan los agricultores de manzanas y uvas del distrito de Calango y Santa Cruz de Flores.

CUADRO N° 17

Grado de conocimiento de los plaguicidas prohibidos de los agricultores de manzanas y uvas del distrito de Calango y Santa Cruz de Flores.

| CONOCIMIENTO | N° DE CASOS | PORCENTAJE |
|--------------|-------------|------------|
| SI | 20 | 100 |
| NO | 00 | 00 |
| TOTAL | 20 | 100 |

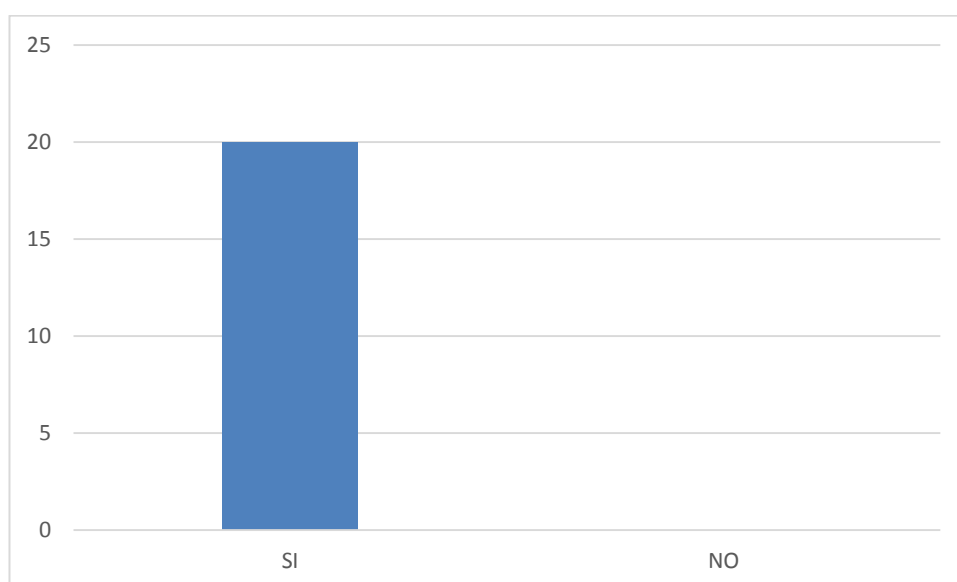


Figura 16: Grado de conocimiento de los plaguicidas prohibidos de los agricultores de manzanas y uvas del distrito de Calango y Santa Cruz de Flores.

CUADRO N° 18

Lugares donde almacenan los plaguicidas los agricultores de manzana y uvas del distrito de Calango y Santa Cruz de Flores.

| LUGARES | N° DE CASOS | PORCENTAJE |
|---------|-------------|------------|
| Cocina | 00 | 00 |
| Patios | 01 | 05 |
| Almacén | 02 | 10 |
| Chacra | 17 | 85 |
| TOTAL | 20 | 100 |

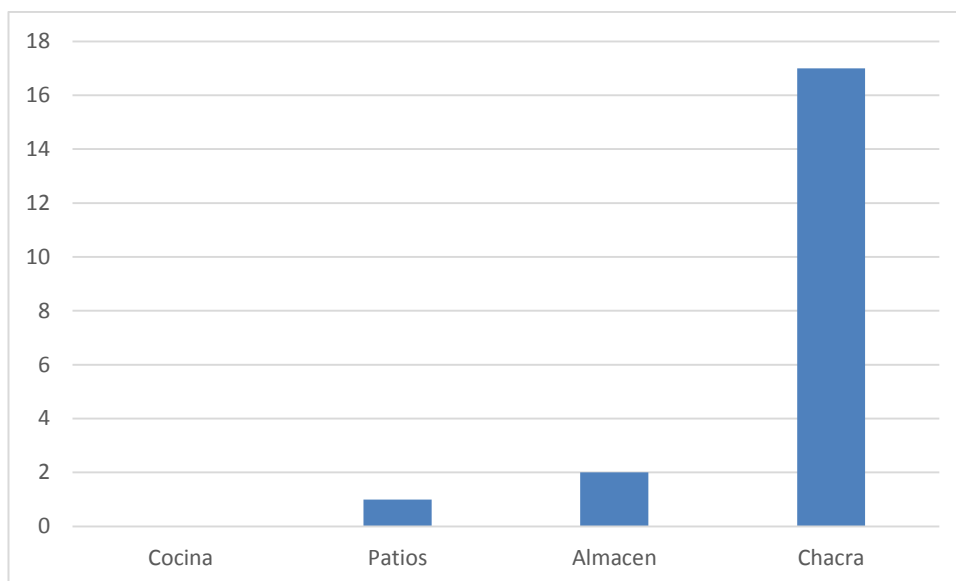


Figura 17: Lugares donde almacenan los plaguicidas los agricultores de manzana y uvas del distrito de Calango y Santa Cruz de Flores.

CUADRO N° 19

Límite máximo permisible (LMP) según plaguicida por fruto, dados por la FAO y el CODEX

| Plaguicida | FRUTA | LMP (mg/Kg) |
|----------------|---------|----------------|
| Tebuconazol | Manzana | 0.5 |
| | Uva | 2 |
| Buprofezin | Manzana | 4 |
| | Uva | 2.5 |
| Piroclostrobin | Manzana | 0,5 |
| | Uva | 2 |
| Cipermetrina | Uva | 0.2 |
| | Manzana | 0.7 |
| Ciprodinil | Uva | 3 |
| | Manzana | 0.05 |

CAPITULO V: DISCUSION

En el presente trabajo se investigó la presencia de plaguicidas órgano fosforados en manzanas y uvas de los valles del distrito de Calango y Santa Cruz de Flores, por ser éstas frutas de gran consumo por el hombre, especialmente los niños que lo llevan en la lonchera.

Para su determinación se empleó el método de QUECHERS que es un método validado por la AOAC 2014, por ser muy sensible y altamente específico para determinar residuos de plaguicidas en alimentos cuyo procedimiento consiste en la elección de los plaguicidas con acetonitrilo en medio de ácido acético y acetato de sodio, seguido de un clean – up con una amina primaria secundaria y sulfato de magnesio, para finalmente ser analizados por cromatógrafo líquido acoplado con un espectrómetro de masa en tándem (LC/MS_MS) y cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS). Con éste método se puede determinar multiresiduos de plaguicidas no solo en manzanas y uvas sino también en otras frutas y vegetales.

Este método sirve para detectar no solamente plaguicidas organofosforados sino también los organocarbámicos, organoclorados, benzimidazoles, piretroides, triazinas, etc.

En lo referente a la presencia de plaguicidas organofosforados en manzanas y uvas procedentes de Calango y Santa Cruz de Flores, no se encontraron dichos plaguicidas según el Cuadro N°1, lo que nos indica que los agricultores de esas zonas están haciendo un buen uso de este tipo de insecticidas, a diferencia del trabajo de Aquino que encontró plaguicidas fosforados en papas.

Según el cuadro N°3, el 75% de las muestras de manzanas y uvas presentan positividad a otros plaguicidas del grupo de los fungicidas no fosforados.

Las muestras de manzanas presentan un 50% de positividad a otros plaguicidas no fosforados, como son la Cipermetrina y el Tebuconazol, según el Cuadro N°10.

En las muestras de uvas se encontró que el 100 % presentaban plaguicidas no fosforados, como son el Buprofezin, el Ciprodenil y el Piraclostrobin.

El 100 % de las Cipermetrinas encontradas no superan el LMR dados por la FAO y el CODEX (0.7mg/Kg).

En el caso del Tebuconazol el 100 % de las muestras no superan el LMR dados por la FAO y el CODEX (0.5 mg/Kg). Lo que nos indica baja contaminación con estos plaguicidas.

En lo respecta a la uva, el 100 % está contaminada con plaguicidas no fosforados, siendo éstos el Buprofenil, el Ciprodenil y el Piraclostrobin.

El Buprofezin no supera el LMR dado por la FAO y el CODEX para la uva (2.5 mg/Kg).

El Ciprodenil presente en las uvas tampoco supera el límite máximo residual (LMR) dados por la FAO y el CODEX (3mg/Kg).

En el caso del Proclostrobin también el 100 % no supera el LMR dados por la FAO y el CODEX para la uva (2mg/Kg).

Esto nos indica que las manzanas y uvas provenientes del Distrito de Calango y Santa Cruz de Flores de la provincia de Cañete, no están contaminadas con plaguicidas en concentraciones que nos puedan ocasionar una intoxicación.

En lo referente al trabajo de campo (encuesta) realizado a los agricultores de dicha zona podemos indicar según el Cuadro N°12 que los grupos etáreos de mayor porcentaje presente es el de 51 – 55 y el de 56 – 60 años (30% cada uno).

En lo referente a como elijen los plaguicidas para su uso, el 75 % indica que es de acuerdo a su criterio, por lo que es necesario realizar charlas informativas del estado y las entidades particulares para prevenir futuras intoxicaciones.

Los agricultores indican según el Cuadro N°15 que reciben información técnica sobre el buen uso de los plaguicidas en un 55 % en forma irregular y un 30 % no reciben información.

Sobre el uso de equipo de protección indican que un 100 % usan guantes y sombreros, un 50 % mascarillas y pañuelos, y solamente un 25 % usan lentes, lo que nos indica que es necesario realizar charlas informativas sobre el buen uso de los plaguicidas, para prevenir que se presenten intoxicaciones.

CONCLUSIONES

- Las manzanas y uvas provenientes de los distritos de Calango y Santa Cruz de Flores no contienen plaguicidas organofosforados.
- Las manzanas y uvas provenientes de Calango y Santa Cruz de Flores presentan plaguicidas que no pertenecen al grupo de los organofosforados.
- Los agricultores de los distritos de Calango y Santa Cruz de Flores reciben información sobre el peligro del uso de los plaguicidas en forma irregular y no utilizan los implementos de protección personal adecuada.

RECOMENDACIONES

1. Se debe recomendar a las autoridades de los Ministerios de Salud y de Agricultura realizar charlas sobre el buen uso de los plaguicidas y como eliminar los envases.
2. Realizar la identificación y cuantificación de plaguicidas en otras frutas y vegetales de amplio consumo humano.
3. Recomendar la aplicación del método de QuEChERS para determinar los residuos de plaguicidas en frutas y otros vegetales por su alta sensibilidad y especificidad para identificar y cuantificar más de 400 plaguicidas.
4. Realizar la investigación de plaguicidas en otros departamentos para comparar el buen uso de estos y su bioeliminación ambiental.
5. Se deben realizar charlas a los agricultores para que utilicen las ropas de protección personal para evitar intoxicaciones por el uso de plaguicidas.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Wikipedia, La Enciclopedia Libre – Plaguicidas. 2010.
Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Plaguicida>
2. Toxicología Y Química Legal: Plaguicidas: Guía de Seminario II Parte, Tema N° 2; La Plata – Argentina. Universidad de la Plata.
Disponible en:
http://www.biol.unlp.edu.ar/toxicologia/seminarios/parte_2/plaguicidas.html
3. *Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina. Chile – 1999.*
Disponible en:
http://www.rapal.org/index.php?seccion=4&f=clasificacion_plaguicidas.php
4. Wattiez, C.2007. En una manzana puede haber más de 30 plaguicidas, * AGRICULTURA E ALLEVAMENTO / AGRICULTURA Y GANADERÍA, Contaminazione, Salute / Contaminación, Salud.
5. Milla C, Palomino H, William R. Niveles de Colinesterasa Sérica en agricultores de la localidad de Carapongo (Perú) y determinación de residuos de plaguicidas inhibidores de la Acetilcolinesterasa en frutas y hortalizas cultivadas. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Lima. UNMSM – 2002
6. Calibres Universales Para Frutas.
Disponible en:
http://www.infoagro.com/instrumentos_medida/medidor.asp?id=301
7. Rice, P. J.; Arthur, E. L.; Barefoot, A. C. 2007. Advances in Pesticides Environmental Fate and Exposure Assessment. J. Agric. Food Chem. 55: 5367-5376.
8. Barra, R. 2002. Ecotoxicología. Exposición y efectos de contaminantes ambientales. Curso de post-grado. Facultad de Ciencias. Montevideo, Uruguay. Julio 2002
9. Comisión del Codex Alimentarius, Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, FAO, 00100 Roma, Italia, Sin año (Fecha de Consulta: 22 de Septiembre del 2010)
Disponible en:
<http://www.fao.org/waicent/faostat/Pest-Residue/pest-s.htm>

10. Valle, P. 2000. "Toxicología de los Alimentos" [en línea] Universidad Nacional Autónoma de México; Instituto Nacional de Salud Pública Centro Nacional de Salud Ambiental
www.bvsde.paho.org/eswww/fulltext/toxicolo/toxico/toxico.pdf [Consulta: 31 de enero 2012]
11. Servicio Agrícola y Ganadero. 2007. Programa de Monitoreo de Residuos de Plaguicidas en Vegetales. RAP-AI-Chile.
12. Ver página electrónica
<http://www.efsa.europa.eu>
13. Ver página electrónica
<http://www.ams.usda.gov>
14. Ver página electrónica
<http://www.beyondpesticides.org>
15. Ver página electrónica
<http://cornucopia.org>
16. Ver página electrónica
<http://www.ecoportal.net>
17. En Chile comemos veneno (<http://olca.cl/oca/plaguicidas/plag36.htm>).
18. Alertan por presencia de Plaguicidas Tóxicos en frutas y verduras (http://www.rel-uita.org/agricultura/agrotoxicos/toxicos_frutas_verduras.htm).
19. Wyss G. 2005 "Producción de uva y Fabricación de vino, Control de la Calidad y Seguridad en las Cadenas de Producción Orgánica" [en línea] Research Institute of Organic Agriculture FiBL and University of Newcastle upon Tyne, Switzerland http://orgprints.org/4928/1/14_VINO.pdf [Consulta: 28 de diciembre 2011]
20. <http://www.scribd.com/doc/5558031/Informe-SAG>
21. Ver página electrónica y documentos de la reunión en http://www.saicm.org/index.php?option=com_content&view=article&id=499;background-2nd-meetingof-the-open-ended-working-group-geneva-15-17-december-2014&catid=92:oweg
22. Campos C, Palacios A, Determinación por HPLC de Residuos de Pesticidas Organofosforado (Methamidophos) en Tomates Comercializados en Lima – Perú [Tesis licenciatura] Perú. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM 2010

23. Jansson, C.; Pihlstrom, T.; Osterdahl, B.-G.; Markides, K.E. A new multiresidue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection J.Chromatogr. A. 2004; 1023: 93-104.
24. AOAC Official Method 2007.01 Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and partitioning with Magnesium Sulfate liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry.
25. Valdivieso, A. Determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en vegetales de consumo directo. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Lima – UNMSM, 1992.
26. Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profile Methamidophos. Oregon State University. 2005
Disponible en:
<http://extoxnet.orst.edu/pips/methamid.htm>
27. Aquino M. Análisis de residuo de plaguicida organofosforado (METHAMIDOPHOS) en muestras de papa de mercados de Lima Metropolitana. Tesis para optar al Título profesional de Químico Farmacéutico. Lima UNMSM 2008.
28. Gepp, V. Mondino. P. 2002. Apuntes sobre funguicidas. Curso de Fitopatología. Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay.
29. Normas Oficiales del Codex Alimentarius, LMR de plaguicidas. 2010
Disponible en:
http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-s.jsp
30. Programa Conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comisión del Codex Alimentarius 31 periodo de sesiones ginebra. Suiza, informe de la 40° reunión del comité del Codex sobre residuos de plaguicidas Hangzhou .abril, 2008.
31. Programa Conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comisión del Codex Alimentarius, 35 periodo de sesiones ginebra. Suiza. informe de La 44° reunión del comité del Codex sobre residuos de plaguicidas Beijing, china. Abril 2012
32. Ramírez L, Determinación de Pesticidas en Vegetales mediante Cromatografía de Gases-Espectrofotometría Masa/Masa (GC-MS/MS) [Tesis licenciatura]. México, Laboratorio de Ciencias Químicas-Biológicas del Instituto de Agroindustrias de la Universidad Tecnológica de la Mixteca. 2009.

33. Pérez A, Segura A, et al, Residuos de Plaguicidas Organofosforados en Cabezuela de Brócoli (*Brassica oleracea*) Determinados por Cromatografía de Gases. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2009.25 (2) 103-110.
34. Zamora, T., Tesis Doctoral de Determinación de residuos de fungicidas en productos vegetales mediante técnicas cromatográficas avanzadas realizado en la Universidad de Jaume I, Castellón, España, Junio 2004
35. PCR ANNUAL REPORT. 2005.
http://www.pesticides.gov.uk/uploadedfiles/Web_Assets/PRC/2005_PRC_Annual_Report.pdf
36. Wiley J. and Sons, Pesticide toxicology and international regulation, Food Standards Agency; London, 2004.
37. Residuos de Pesticidas en Alimentos. Instituto de Toxicología y Seguridad Alimentaria. Dinamarca – 2002
38. http://64.233.169.104/search?q=cache:xc6wI5S2IYIJ:www.agroucayali.gob.pe/ultima_noticia3.shtml+CONAM+/plaguicidas&hl=es&ct=clnk&cd=4&gl=pe
39. Hamaya, T.; Yoshida, H.; Todoroki, K.; Nohta, H.; Yamaguchi, M. Determination of polar organophosphorus pesticides in water samples by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008; 22: 2203-2210.
40. P.D.McDonald, "The Quest for Ultra Performance in Liquid Chromatography: Origins of UPLC Technology", Waters Ireland, 2009.
41. Lehotay S. (2007), *J.AOAC int.* 90, 490-520", Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study.
42. Murcia A. Stashenco T, et al Determinación de Plaguicidas Organofosforado en Vegetales Producidos en Colombia. *Revista Agro Sun (Colombia)* 2008; Vol. 36(2):70-71
43. OPS/OMS. Plaguicidas y salud en las Américas. Serie Ambiental 2. Washington, OPS, 1993
44. Eddleston M, Singh S, Buckley N. Organophosphorous Poisoning (Acute). *Clinical Evidence*. 2005;13:1744-55
45. ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO, 2011.
"Situación y estadísticas del sector vitivinícola mundial" [en línea]
<http://www.oiv.int/oiv/info/esstatistiquessecteurvitivinicole>

[Consulta: 16 de noviembre 2011]

46. Hernandez J. Intoxicación por Plaguicidas y Organofosforados. En: Guías de Práctica Clínica: Toxicología, Hospital Universitario San Ignacio 2004;2:84-91.
47. Costa LG. Toxicology of Pesticides. A brief history. En: Costa LG, Galli CL y Murphy SD, editors, Toxicology of Pesticides: Experimental, clinical and regulatory perspectives. NATO ASI Series. Berlin: Springer-Verlag, 1986: 1-10.
48. Pilkington A, Buchanan D, Jamal GA, Gillham R, Hansen S, Kidd M et al. An epidemiological study of the relations between exposure to organophosphate pesticides and indices of chronic peripheral neuropathy and neuropsychological abnormalities in sheep farmers and dippers. Occup Environ Med 2001; 58: 689-690

ANEXOS

Anexo N°1

Tabla 1 Plaguicidas analizados por HPLC-MS-MS

| | | | |
|----|---------------|----|------------------|
| 1 | Acefato | 39 | Imidacloprid |
| 2 | Acetamiprid | 40 | Isoprothiolano |
| 3 | Asulam | 41 | Isoxaflutol |
| 4 | Atrazina | 42 | Linuron |
| 5 | Bupirimate | 43 | Metalaxil |
| 6 | Buprofezina | 44 | Metamidofos |
| 7 | Carbaril | 45 | Methoxifenozone |
| 8 | Carbofurano | 46 | Metil azinfos |
| 9 | Carboxin | 47 | Metil Kresoxim |
| 10 | Ciproconazol | 48 | Metil oxidemeton |
| 11 | Clofentezina | 49 | Metil Pirimiphos |
| 12 | Clorpirifos | 50 | Metil Tiofanato |
| 13 | Cymoxanilo | 51 | Metil Tolclophos |
| 14 | Diazinon | 52 | Metiocarb |
| 15 | Diclorvos | 53 | Metomilo |
| 16 | Dicrotofos | 54 | Miclobutanilo |
| 17 | Dietofencarb | 55 | Ometoato |
| 18 | Difenoconazol | 56 | Oxadixilo |
| 19 | Diqlubenzuron | 57 | Oxamilo |
| 20 | Dimetoato | 58 | Oxicarboxina |
| 21 | Dimetomorfo | 59 | Penconazol |
| 22 | Diniconazol | 60 | Primetanil |
| 23 | Diuron | 61 | Pirimicarb |
| 24 | Etiofencarb | 62 | Procloraz |
| 25 | Etofenprox | 63 | Profenofos |
| 26 | Famoxadona | 64 | Propiconazol |
| 27 | Fenamifos | 65 | Rotenona |
| 28 | Fenarimol | 66 | Tebuconazol |
| 29 | Fenazaquina | 67 | Tebufenozide |
| 30 | Fenexamida | 68 | Tetraconazol |

| | | | |
|----|-----------------|----|------------------|
| 31 | Fenoxicarb | 69 | Tiacloprid |
| 32 | Fenpyroximato | 70 | Tiodicarb |
| 33 | Fention | 71 | Triademefon |
| 34 | Fentoato | 72 | Triadimenol |
| 35 | Flusilazol | 73 | Trifloxystrobina |
| 36 | Forclorbenzuron | 74 | Triflumizol |
| 37 | Fosfamidon | 75 | Tiodicarb |
| 38 | Hexitazox | 76 | Triadimefon |

Tabla 2 Plaguicidas analizados por UPLC-MS-MS

| | | | |
|----|---------------|----|------------------|
| 1 | Acetamiprid | 42 | Iprodiona |
| 2 | Aldicarb | 43 | Isoprotiolano |
| 3 | Ametrina | 44 | Kresoxim metil |
| 4 | Atrazina | 45 | Linuron |
| 5 | Azoxistrobin | 46 | Lufenuron |
| 6 | Benalaxil | 47 | Metalaxil |
| 7 | Bupirimato | 48 | Metamidofos |
| 8 | Buprofezin | 49 | Metiocarb |
| 9 | Cadusafos | 50 | Metomilo |
| 10 | Carbaril | 51 | Metoxifenozone |
| 11 | Carbendazim | 52 | Miclobutanilo |
| 12 | Ciproconazol | 53 | Novaluron |
| 13 | Ciprodinil | 54 | Ometoato |
| 14 | Clofentezina | 55 | Oxadixilo |
| 15 | Clorpirifos | 56 | Oxamil |
| 16 | Diazinon | 57 | Oxicarboxina |
| 17 | Diclorvos | 58 | Oxidemeton metil |
| 18 | Dicrotofos | 59 | Penconazol |
| 19 | Difenoconazol | 60 | Piraclostrobin |
| 20 | Diqlubenzuron | 61 | Piridaben |

| | | | |
|----|---------------|----|-----------------|
| 21 | Dimetoato | 62 | Pirimicarb |
| 22 | Dimetomorfo | 63 | Pirimetanil |
| 23 | Diniconazol | 64 | Pirimifos metil |
| 24 | Diuron | 65 | Piriproxifen |
| 25 | Etoprofos | 66 | Procloraz |
| 26 | Fenamifos | 67 | Profenofos |
| 27 | Fenarimol | 68 | Prometrina |
| 28 | Fenazaquina | 69 | Propiconazol |
| 29 | Fenexamida | 70 | Rotenona |
| 30 | Fenbuconazol | 71 | Tebuconazol |
| 31 | Fention | 72 | Teflubenzuron |
| 32 | Fenoxicarb | 73 | Tetraconazol |
| 33 | Fenpiroximato | 74 | Tiabendazol |
| 34 | Fentoato | 75 | Tiacloprid |
| 35 | Fosfamidon | 76 | Tiofanato metil |
| 36 | Flufenoxuron | 77 | Tolcofos metil |
| 37 | Flusilazol | 78 | Triadimefon |
| 38 | Hexitiazox | 79 | Triazofos |
| 39 | Imazalil | 80 | Triadimenol |
| 40 | Imidacloprid | 81 | Trifloxistrobin |
| 41 | Indoxacarb | 82 | Triflumuron |

Anexo N°2

Plaguicidas analizados por GC-MS y sus iones m/z

| Compuesto | Tiempo de retención (min)* | m/z cuantificación** | m/z confirmación | m/z confirmación |
|--------------------------|----------------------------|----------------------|------------------|------------------|
| o,o,o Tietilortiofosfato | 7.431 | 198 | 121 | 143 |
| Diclorvos | 8.72 | 185 | 109 | 145 |
| Hexaclorociclopentadieno | 9.98 | 237 | 239 | 235 |
| Carbofurano 3-hidroxi | 11.621 | 180 | 147 | 137 |
| Etridiazol | 11.541 | 211 | 183 | 140 |
| Cloroneb | 12.242 | 193 | 191 | 206 |
| 2-fenilfenol | 12.46 | 170 | 169 | 141 |
| Tionazin | 13.396 | 143 | 192 | 108 |
| Propacloro | 13.461 | 120 | 106 | 107 |
| Etoprofos | 13.778 | 158 | 139 | 200 |
| Trifuralina | 14.082 | 306 | 264 | 248 |
| Dicrotofos | 14.18 | 237 | 193 | 127 |
| Sulfotep | 14.178 | 322 | 202 | 266 |
| Forate | 14.448 | 260 | 121 | 131 |
| HCH-alfa | 14.584 | 219 | 183 | 217 |
| Hexaclorobenceno | 14.681 | 284 | 282 | 286 |
| Dimetoato | 14.84 | 125 | 87 | 143 |
| Carbofuran | 14.944 | 164 | 149 | 122 |
| Simazina | 14.998 | 201 | 186 | 206 |
| Atrazina | 15.085 | 215 | 202 | 200 |
| HCH-beta | 15.144 | 219 | 183 | 219 |
| Propazina | 15.149 | 229 | 172 | 229 |
| Clomazona | 15.163 | 204 | 125 | 127 |
| Qunitoceno | 15.213 | 249 | 295 | 239 |

| | | | | |
|--------------------------|--------|-----|-----|-----|
| (pentacloronitrobenceno) | | | | |
| Lindano (HCH-gamma) | 15.311 | 183 | 217 | 219 |
| Diazinon | 15.482 | 304 | 137 | 179 |
| Clorotalonilo | 15.682 | 266 | 264 | 268 |
| Disulfoton | 15.725 | 274 | 125 | 274 |
| Teflutrin | 15.748 | 177 | 197 | 178 |
| HCH-delta | 15.892 | 219 | 183 | 217 |
| Fosfamidon | 16.3 | 264 | 127 | 138 |
| Diclofention | 16.361 | 279 | 223 | 162 |
| Metribucina | 16.493 | 198 | 144 | 103 |
| Vinclozolina | 16.568 | 285 | 124 | 178 |
| Paration metil | 16.62 | 263 | 109 | 125 |
| Alacloro | 16.644 | 160 | 188 | 146 |
| Heptacloro | 16.834 | 274 | 100 | 272 |
| Prometrina | 16.834 | 226 | 184 | 105 |
| Ametrina | 16.784 | 212 | 227 | 170 |
| Pirimifos metil | 17.032 | 290 | 276 | 305 |
| Terbutrin | 17.103 | 226 | 241 | 185 |
| Fenitotrión | 17.122 | 260 | 109 | 277 |
| Malation | 17.273 | 173 | 125 | 127 |
| Metolacoloro | 17.411 | 162 | 238 | 146 |
| Clorpirifos | 17.439 | 314 | 197 | 316 |
| Cianazina (bladex) | 17.428 | 212 | 225 | 198 |
| Fention | 17.519 | 278 | 125 | 169 |
| Clortal dimetil (DCPA) | 17.554 | 301 | 303 | 232 |
| Aldrin | 17.575 | 263 | 265 | 261 |
| Paration | 17.587 | 291 | 139 | 245 |
| Bromofos metil | 17.91 | 331 | 239 | 333 |
| Fipronil | 18.225 | 367 | 368 | 369 |
| Tolilfluánida | 18.35 | 238 | 137 | 181 |
| Heptacloroepoxido | 18.406 | 353 | 355 | 351 |
| Fentoato | 18.455 | 274 | 125 | 246 |
| Procimidona | 18.6 | 283 | 125 | 246 |

| | | | | |
|--------------------|--------|-----|-----|-----|
| Folpet | 18.72 | 260 | 149 | 264 |
| Metidation | 18.849 | 145 | 93 | 125 |
| Clordano cis | 18.954 | 373 | 375 | 377 |
| Clordano trans | 19.266 | 373 | 375 | 377 |
| Endosulfan alfa | 19.27 | 239 | 237 | 241 |
| Profenofos | 19.595 | 337 | 208 | 339 |
| 4,4'-DDE | 19.726 | 318 | 316 | 248 |
| Bupirimato | 19.824 | 273 | 166 | 316 |
| Cresoxim metilo | 19.844 | 206 | 116 | 313 |
| Dieldrin | 19.877 | 263 | 277 | 279 |
| Clorfenapir | 20.049 | 247 | 328 | 406 |
| Endrin | 20.363 | 261 | 263 | 265 |
| Clorobencilato | 20.445 | 139 | 251 | 253 |
| Endosulfan beta | 20.591 | 195 | 241 | 207 |
| 4,4-DDD | 20.661 | 235 | 165 | 237 |
| Endrin aldehido | 20.912 | 345 | 248 | 250 |
| Triazofos | 20.955 | 161 | 162 | 172 |
| Famfur | 21.119 | 217 | 125 | 218 |
| Benalaxil | 21.158 | 266 | 148 | 204 |
| Propiconazol I | 21.311 | 259 | 173 | 261 |
| Endosulfan sulfato | 21.416 | 387 | 274 | 420 |
| Propiconazol II | 21.414 | 259 | 173 | 261 |
| 4,4-DDT | 21.465 | 235 | 237 | 236 |
| Propargita (omite) | 21.78 | 350 | 173 | 350 |
| TPP | 21.834 | 326 | 325 | 215 |
| Piperonil butoxido | 21.879 | 176 | 177 | 149 |
| Iprodiona | 22.309 | 314 | 316 | 187 |
| Carbosulfan | 22.45 | 160 | 118 | 163 |
| Endrin cetona | 22.433 | 317 | 315 | 319 |
| Bifentrin | 22.423 | 181 | 166 | 165 |
| Bromopropilato | 22.524 | 341 | 183 | 339 |
| Metoxicloro | 22.616 | 227 | 228 | 212 |
| Fenpropatrina | 22.637 | 181 | 265 | 349 |

| | | | | |
|--------------------|--------|-----|-----|-----|
| Azinfos metil | 23.208 | 160 | 132 | 105 |
| Piriproxifen | 23.346 | 136 | 115 | 96 |
| Amitraz | 23.503 | 293 | 132 | 121 |
| Lambda-Cihalotrina | 23.51 | 181 | 197 | 208 |
| Azinfos ethyl | 23.936 | 160 | 132 | 105 |
| Benfuracarb | 23.75 | 190 | 163 | 102 |
| Fenoxaprop-P-etil | 24.166 | 288 | 361 | 290 |
| Permetrina Cis | 24.464 | 183 | 163 | 165 |
| Permetrina trans | 24.648 | 183 | 163 | 165 |
| Cifutin I | 25.206 | 206 | 165 | 163 |
| Cifutin II | 25.328 | 206 | 165 | 163 |
| Cifutin III | 25.443 | 163 | 165 | 206 |
| Cifutin IV | 25.551 | 163 | 165 | 206 |
| Cipermetrina I | 25.676 | 181 | 163 | 165 |
| Cipermetrina II | 25.848 | 181 | 163 | 165 |
| Cipermetrina III | 25.96 | 181 | 163 | 165 |
| Cipermetrina IV | 26.057 | 181 | 163 | 165 |
| Fenvalerato I | 27.305 | 181 | 167 | 125 |
| Tau-fluvalinato I | 27.533 | 250 | 252 | 181 |
| Tau-fluvalinato II | 27.687 | 250 | 252 | 181 |
| Fenvalerato II | 27.73 | 125 | 167 | 181 |
| Deltametrina I | 28.497 | 181 | 253 | 251 |
| Deltametrina II | 28.988 | 181 | 253 | 251 |
| Azoxistrobina | 29.4 | 344 | 388 | 345 |

*El tiempo de retención, varía con el uso de la columna y con diferentes columnas.

** el m/z de cuantificación puede variar si existe o no interferencia en la muestra.

Anexo N°3

Listado de Matrices implementadas

| Matriz | MgSO4 150 mg/ml | PSA 50 mg/ml | C-18 50 mg/ml | Carbón 7.5 mg/ml |
|---|------------------------|---------------------|----------------------|-------------------------|
| Cítricos (Mandarina, naranja, limón) | x | x | x | x |
| Mango | x | x | x | x |
| Palto | x | x | x | x |
| Esparrago | x | x | ----- | x |
| Banano | x | x | x | x |
| Paprika(especies) | x | x | x | x |
| Uva | x | x | x | x |
| Tomate | x | x | ---- | x |
| Cebolla | x | x | ---- | ---- |
| Aceituna | x | x | x | x |
| Café (cacao) | x | x | x | X |
| Cereales (quinua,arroz,pallar,soya,frijol) | x | x | x | ---- |
| Nuez (frutos secos) | x | x | x | --- |

Anexo N°4

Plaguicidas analizados por HPLC-MS-MS, modo de ionización ESI positivo y modo de adquisición MRM(Monitoreo Reacción Multiple)

| Pesticidas | Transición MS/MS | Cono de Voltaje (V) | Energía de Colisión (ev) | Función |
|--------------------|------------------|---------------------|--------------------------|---------|
| Metamidofos | 141,8 > 93,9 | 20 | 20 | 1 |
| Acefato | 184,1 > 142,9 | 15 | 20 | 1 |
| Carbendazim | 192 > 160 | 30 | 20 | 1 |
| Asulam | 231,1 > 156 | 20 | 10 | 1 |
| Oxamilo | 237,1 > 72,1 | 10 | 15 | 1 |
| Himexazol | 100,1 > 54,2 | 30 | 10 | 1 |
| Metil oxidemeton | 247,1 > 169,1 | 20 | 10 | 1 |
| Tiabendazol | 202 > 175 | 30 | 25 | 1 |
| Dicrotofos | 238,2 > 112,1 | 25 | 10 | 1 |
| Pimetrozina | 218.2 > 105.1 | 28 | 18 | 1 |
| Aldicarb sulfóxido | 229.2 > 109.1 | 25 | 20 | 1 |
| Tiacloprid | 253.2> 126.0 | 25 | 20 | 1 |
| Metomil | 163.2 >106.1 | 20 | 10 | 1 |
| Ometoato | 214.2 >155.1 | 25 | 15 | 1 |
| Pirimicarb | 239.3 > 182.2 | 25 | 15 | 1 |
| Imidacloprid | 256 > 209,1 | 25 | 20 | 2 |
| Dimetoato | 229,9 > 124,9 | 15 | 18 | 2 |
| Acetamiprid | 223 > 126 | 25 | 25 | 2 |
| Imazalil | 297 > 158,9 | 19 | 28 | 2 |
| Oxicarboxina | 268,1 > 175 | 25 | 15 | 2 |
| Cymoxanilo | 199,1 > 128,1 | 15 | 10 | 2 |
| Aldicarb | 213 > 89 | 25 | 15 | 2 |
| Carbofurano | 222 > 165 | 20 | 15 | 3 |

| | | | | |
|----------------------|------------------|----|----|---|
| Diclorvos | 220,9 > 108,8 | 28 | 25 | 3 |
| Metil Tiofanato | 343,1 > 151,1 | 25 | 20 | 3 |
| Fosfamidon | 300,1 > 174,1 | 30 | 15 | 3 |
| Carboxin | 236,1 > 143 | 25 | 15 | 3 |
| Carbaril | 202 > 144,9 | 20 | 15 | 3 |
| Tiodicarb | 355 > 88 | 20 | 20 | 3 |
| Atrazina | 216 > 174 | 30 | 20 | 3 |
| Metalaxil | 280,2 > 192,2 | 25 | 20 | 3 |
| Diuron | 232,9 > 72 | 25 | 20 | 3 |
| Metidation | 303 > 145,1 | 30 | 25 | 3 |
| Metil azinfos | 340 > 132,1 | 30 | 20 | 3 |
| Dimetomorfo | 388,1 > 301,1 | 30 | 20 | 3 |
| Procimidona | 285,1 > 257,2 | 20 | 10 | 3 |
| Isoxaflutol | 360 > 251.1 | 25 | 25 | 3 |
| Fenamifos | 304.1 > 217.2 | 30 | 20 | 3 |
| Dietofencarb | 268.2 > 226.3 | 20 | 10 | 3 |
| Tebufenozide | 353.2 > 133.1 | 15 | 20 | 3 |
| Fentoato | 321.1 > 163.2 | 15 | 10 | 3 |
| Pirimetanil | 200.3 > 107.2 | 30 | 25 | 3 |
| Tetraconazol | 372.1 < 159.1 | 30 | 30 | 3 |
| Fenoxicarb | 302.3 > 116.1 | 20 | 10 | 3 |
| Tidiazuron | 219,1 > 100 | 30 | 10 | 4 |
| Forclorfenuron | 246,1 > 126,9 | 30 | 10 | 4 |
| Metil Bensulfuron | 409 > 254,1 | 30 | 10 | 4 |
| Ciclosulfamuron | 420,1 > 265,1 | 30 | 10 | 4 |
| Pyrazosulfuron | 413,1 > 232,1 | 35 | 15 | 4 |
| Diflubenzuron | 309 > 289,1 | 25 | 10 | 4 |
| Fipronil | 278,1 > 124,9 | 25 | 25 | 5 |
| Linuron | 249 > 159,9 | 30 | 20 | 5 |
| Metiocarb | 226,1 > 121 | 20 | 25 | 5 |

| | | | | |
|------------------|---------------|----|----|---|
| Isoprothiolano | 291,1 > 189 | 20 | 20 | 5 |
| Methoxifenozone | 369,2 > 313,2 | 20 | 10 | 5 |
| Bupirimato | 317,1 > 166,1 | 30 | 25 | 5 |
| Triadimefon | 294,1 > 197,1 | 30 | 15 | 5 |
| Myclobutanil | 289,1 > 70,1 | 35 | 25 | 5 |
| Triadimenol | 296,1 > 70,1 | 20 | 10 | 5 |
| Ciproconazol | 292,1 > 70,1 | 25 | 20 | 5 |
| Fenarimol | 331 > 268,2 | 40 | 20 | 5 |
| Fenexamida | 302,1 > 97,1 | 38 | 28 | 5 |
| Rotenona | 395,2 > 213,3 | 15 | 25 | 5 |
| Flusilazol | 316,1 > 165,1 | 35 | 25 | 5 |
| Metil Kresoxim | 314,1 > 267,1 | 15 | 10 | 5 |
| Procloraz | 376 > 308,1 | 30 | 12 | 5 |
| Tebuconazol | 308,1 > 70,1 | 35 | 20 | 5 |
| Penconazol | 284,1 > 159 | 30 | 35 | 5 |
| Fention | 279,1 > 169,1 | 30 | 25 | 5 |
| Trifenilfosfato | 327 > 77 | 25 | 20 | 5 |
| Propiconazol | 342,1 > 159 | 30 | 25 | 5 |
| Famoxadona | 392 > 331,2 | 20 | 10 | 5 |
| Metil Tolclophos | 301,1 > 175,1 | 25 | 25 | 5 |
| Metil Pirimiphos | 306,1 > 164,1 | 30 | 25 | 5 |
| Diniconazol | 326 > 70,1 | 30 | 20 | 5 |
| Clofentezina | 303 > 138 | 20 | 15 | 5 |
| Difenoconazol | 406 > 251 | 35 | 25 | 5 |
| Triflumizol | 346 > 278,1 | 15 | 10 | 5 |
| Teflubenzuron | 378,9 > 196 | 25 | 25 | 6 |
| Fenpyroximato | 422,1 > 366,1 | 25 | 18 | 7 |
| Profenofos | 375 > 305 | 30 | 20 | 7 |
| Buprofezina | 306,1 > 201,2 | 20 | 12 | 7 |
| Hexithiazox | 353,1 > 168,1 | 25 | 25 | 7 |
| Chlorpirifos | 351,8 > 199,8 | 20 | 20 | 7 |
| Fenpropathrin | 350,3 > 125,1 | 25 | 25 | 7 |
| Pyridaben | 365,1 > 309,1 | 25 | 15 | 7 |

| | | | | |
|-----------------|---------------|----|----|---|
| Fenazaquina | 307,2 > 161,2 | 30 | 15 | 7 |
| Etofenprox | 394,3 > 177,2 | 20 | 15 | 7 |
| Trifloxystrobin | 409.2 > 186.2 | 20 | 25 | 7 |

Anexo N°5

ENCUESTA

INSTRUCCIONES: La encuesta es anónima, marcar con un aspa (x) o completar la respuesta correcta en los espacios en blanco.

1. Edad:.....
2. Sexo: M () F ()
3. Estado Civil: S () C ()
V () D () CON ()
4. Grado de Instrucción: P. Com ()
PInc () ANA () SE () SUP () TEC ()
5. Composición Familiar N°.....
6. Ocupación:.....
7. Nombre los plaguicidas que emplea Ud. en el cultivo de las uvas :.....
.....
.....
Manzanas.....
.....
.....
.....
8. ¿Cuál es la dosis de plaguicida que emplea?
.....
9. ¿En qué lugares adquiere los plaguicidas que usa?
.....
10. ¿En qué momento hace uso de los plaguicidas?
.....
11. ¿Cómo elige que plaguicida usar?
 - Por asesoría técnica ()
 - Por recomendación de un amigo o vecino ()
 - Por su propio criterio ()
 - Por recomendación del vendedor ()
12. Recibe información técnica adecuada para el manejo y uso de los plaguicidas:
Sí () No () Irregularmente ()
13. Si la respuesta a la pregunta 12 es sí, dicha información proviene de:
 - a. Ministerio de Agricultura ()
 - b. Proveedor de plaguicidas ()
 - c. Otros:.....

14. Durante la fumigación Ud. Fuma o come: Sí () No ()
15. Marque el equipo que usa para protegerse:
 Guantes () Mascarilla () Anteojos ()
 Sombrero () Ropa de protección ()
16. Tiene conocimiento sobre los plaguicidas prohibidos y los permitidos por Ley: Sí () No ()
17. El uso de plaguicidas en sus productos lo hace en forma rotatoria. Sí () No ()
18. Ha sufrido alguna vez algún proceso de intoxicación por plaguicidas: Sí () No ()
19. Tipo de intoxicación Voluntaria () Laboral () Provocada ()
20. Atención recibida: Médico () Enfermera ()
 Paramédico () Otro ()
21. Ha presentado alguna vez los siguientes signos o síntomas:
 Náuseas, diarreas, vómitos () Cólicos, calambres ()
 Dolor de cabeza () Dolor muscular ()
 Visión borrosa () Salivación ()
 Bradicardia () Olvidos ()
22. Hay presencia de Malformación congénita en hijos
 Si () No ()
23. Sus cultivos han padecido algún fenómeno de plagas:
 Sí () No ()
24. Ud. emplea el plaguicida bajo la presentación de:
 S. Polvos () S. Gránulos () Líquidos () Otros ()
25. ¿Cómo elimina los envases?
 Queman () Entierran () Cortan ()
 Otros.....
26. ¿En qué lugares almacena los envases?
 Cocina () Patio () Almacén ()
 Otro.....